

DENISE KAWATA

**POLÍMERO DERIVADO DO ÓLEO DE MAMONA
ACRESCIDO DE CÁLCIO, ASSOCIADO OU NÃO A MEDULA
ÓSSEA AUTÓGENA NA REPARAÇÃO DE FALHAS ÓSSEAS
EXPERIMENTAIS EM COELHOS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

A Deus, pela vida e seus milagres.

À minha família, pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária pela acolhida e possibilidade de realização do mestrado em Medicina Veterinária.

Ao Professor Ricardo Junqueira Del Carlo, pela orientação, compreensão e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Marlene Isabel Vargas Vitoria pela ajuda na interpretação dos resultados histológicos e fotografias.

Ao Professor Sérgio da Matta pela companhia e orientação na confecção dos cortes histológicos, cessão de espaço e equipamento laboratorial do Setor de Morfologia do Departamento de Biologia Geral.

Ao Professor Cláudio César Fonseca pela orientação quanto a manipulação e técnicas de coloração do material histológico.

Ao Professor Eldo Antônio Monteiro da Silva, pela cessão das navalhas para corte histológico e equipamento fotográfico.

Ao Doutor Paulo Azevedo pela cessão do “Kit Comercial” Composto Ósseo de Rícinus.

Aos médicos veterinários Richard Filgueiras, Alfredo Maia Filho, Damaris Oliveira, Alessandra Maria da Silva, Alessandra Sayegh, Simone Galvão, Maria Esther Odenthal e a graduanda Denise Marchesi pelo inestimável auxílio em toda a fase experimental e laboratorial deste experimento.

À médica veterinária Simone Rezende Galvão pela leitura e sugestões nas primeiras versões da tese.

Aos funcionários da esterilização Terezinha, Maria José, Sônia, Divina e Claudiomiro; funcionários da Microbiologia, Luís Carlos, Paulo, Élcio; funcionários da Patologia Veterinária, Adão e Cláudio, pela gentileza e presteza de seus serviços.

Às secretárias Eloísa, Cléia, Rose e Geraldinho, pela gentileza e cuidado relativo a documentos e prazos.

Aos amigos que encontrei em Viçosa, pela companhia e apoio.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram na execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

DENISE KAWATA, filha de Hideki Kawata e Mitiko Imoto Kawata, nasceu em 18 de maio de 1971 na cidade de São Paulo.

Em janeiro de 1994 graduou-se em Medicina Veterinária na Universidade de São Paulo.

Em fevereiro de 1995 ingressou na Residência em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo, concluindo-a em janeiro de 1997.

De março a agosto de 1997, realizou estágios em cirurgia e emergência de pequenos animais nos hospitais-escola da Universidade da Flórida e Universidade da Pensilvânia.

Em agosto de 1999 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Poliuretana derivada do óleo de mamona	4
2.2. Alopásticos	5
2.3. Biocompatibilidade e resposta inflamatória	8
2.4. Osteocondução na regeneração óssea	10
2.5. Aplicações da medula óssea osteogênica	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
4. RESULTADOS	19
4.1. Avaliação radiográfica	19
4.2. Avaliação macroscópica	25
4.3. Avaliação microscópica	25
4.3.1. Grupo controle	25
4.3.2. Grupo P	25
4.3.3. Grupo M	26
4.3.4. Polímero implantado na região abdominal	27
4.3.4.1. Polímero isolado	27
4.3.4.2. Polímero associado à medula óssea	27
5. DISCUSSÃO	34
6. RESUMO E CONCLUSÕES	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Época de sacrifício dos animais dos grupos experimentais	15
Fig. 2. Representação da implantação dos polímeros no abdômen dos coelhos ...	15
Fig. 3. “Kit” comercial contendo os constituintes do polímero	18
Fig. 4. Aspectos macro e microscópico do polímero	18
Fig. 5. Radiografia pós-operatória	21
Fig. 6. Radiografia de animal do grupo P às três semanas	21
Fig. 7. Radiografia de animal do grupo P às 3, 6 e 9 semanas	22
Fig. 8. Radiografia de animal do grupo P às 9 semanas	22
Fig. 9. Radiografia de animal do grupo M às 6 semanas	23
Fig. 10. Radiografia de animal do grupo M às 3 e 6 semanas	23
Fig. 11. Radiografia de animal do grupo M às 3, 6 e 9 semanas	24
Fig. 12. Aspecto histológico da interface polímero/tecido ósseo	28
Fig. 13. Aspecto histológico do polímero associado à medula óssea. Grupo P...	29
Fig. 14. Marcação do crescimento ósseo com tetraciclina.	
Grupo P aos 63 dias	30
Fig. 15. Marcação do crescimento ósseo com tetraciclina. Grupo M	31
Fig. 16. Marcação do crescimento ósseo com tetraciclina. Grupo M	32
Fig. 17. Aspecto histológico da formação de osso novo.	
Grupo M aos 21 dias	33

RESUMO

KAWATA, DENISE, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2001.
Polímero derivado do óleo de mamona acrescido de cálcio, associado ou não a medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas experimentais em coelhos. Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Luiz Gonzaga Pompermayer.

Foram avaliados o processo de reparação tecidual e o comportamento do implante do polímero vegetal extraído do óleo de mamona com 40% de carbonato de cálcio, associado ou não à impregnação com medula óssea autógena, em falhas ósseas experimentais em raios de 30 coelhos e em sítio heterotópico de seis animais. Em quinze coelhos, a falha óssea no rádio direito foi preenchida por cilindros de polímero de mamona (grupo P) com dimensões semelhantes às das falhas; o rádio direito dos outros coelhos recebeu aspirado de medula óssea autógena junto com o implante (grupo M). As falhas ósseas do membro esquerdo não receberam nenhum tratamento e serviram como controle. Cada um dos seis coelhos restantes recebeu seis implantes no músculo reto abdominal (sítio heterotópico), sendo que em três animais, os implantes estavam embebidos em aspirado de medula óssea autógena. Ambos os grupos apresentaram aumento da radiopacidade no local do implante, sem desvio de eixo ósseo ou reabsorção das extremidades ósseas receptoras. O grupo P apresentou áreas irregulares de calcificação na região periférica e sobre o polímero e o M apresentou um padrão de radiopacidade mais intenso, regular e precoce em relação ao P. Na avaliação histológica, foram observadas formação de tecido ósseo imaturo com tendência a organização, brotos isolados de formação de osso novo sobre o polímero em seus

poros superficiais e nos poros internos que se comunicavam. O implante permitiu a ocorrência de osteogênese e osteocondução e a formação de osso novo foi progressiva e em maior quantidade quando associado ao aspirado medular; houve migração de capilares, tecidos perivasculares e células osteoprogenitoras entre os poros, com tecido fibrovascular invadindo a superfície do implante; a incorporação dos implantes deu-se de maneira lenta e estava incompleta até as nove semanas do estudo; o implante foi biocompatível no período avaliado. Em sítio heterotópico, o implante foi incapaz de induzir a formação óssea e histologicamente, em ambos os sítios de implantação, foram identificadas células gigantes e tecido fibroso envolvente.

ABSTRACT

KAWATA, DENISE, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December, 2001.
Castor oil plant polymer with calcium associated or not to autogenous bone marrow in the repair of experimental bone gaps in rabbits. Advisor: Ricardo Junqueira Del Carlo. Committee members: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Luiz Gonzaga Pompermayer.

In order to evaluate tissue repair after the use of castor oil polymer implant added with 40% calcium carbonate, isolated or associated to autogenous bone marrow in heterotopic site and in experimental bone gaps in radii of rabbits, 30 White New Zealand rabbits were submitted to bilateral radial osteotomy. In 15 rabbits the bone gap of the right side was filled with polymer cylinders (group P) of similar size of the gaps; the remaining rabbits received autogenous bone marrow with the implant (group M). The bone gaps of the left limb did not receive any treatment and served as control. Six rabbits received 6 implants in the *Rectus abdominus* muscle (heterotopic site) and in three of these rabbits the implants were associated with bone marrow. In the radiographic study both groups presented increased radiopacity at the implant site without bone axis deviation or resorption of the receptor bone ends. Group P presented irregular calcification areas at the peripheral region and over the polymer. Group M presented a more intense, regular and precocious radiopacity pattern in relation to group P. In microscopical evaluation there was evidence of immature bone tissue formation tending to organize itself, isolated buds of neoformed bone over the polymer and its superficial pores. It was concluded that the implant allows osteogenesis and osteoconduction in bone gaps, and bone formation was progressive, especially

when added with bone marrow aspirate; there was capillary, perivascular tissue and osteoprogenitor cells migrating into the pores, with fibrovascular tissue permeating the implant surface; implants incorporation was slow and was found incomplete until 9 weeks of the study; the implant was able to induce foreign-body reaction without toxic or secondary adverse reactions to its presence. In heterotopic and orthotopic sites, the implant was not able to induce bone formation, inciting mild foreign-body reaction with giant cells and surrounding fibrous layer.

1. INTRODUÇÃO

A reposição cirúrgica de perdas ósseas representa uma necessidade e um desafio constantes na prática clínica, sendo secundária a uma gama de situações como traumatismos, infecções, malformações congênitas e ressecções neoplásicas.

A indicação de métodos que determinam a reparação é de caráter funcional, restabelecendo condições de sustentação para aplicação de forças mecânicas, havendo ainda indicações estéticas para redefinição de contornos ou de proteção aos tecidos adjacentes (DUJONI et al., 1997).

A idéia mais lógica neste processo de reposição corresponde à utilização do próprio tecido ósseo, preferencialmente com enxertos livres autógenos, ou também de tecido homólogo, heterólogo, desmineralizado ou ainda através de transferências ósseas utilizando microcirurgia (KORLOF et al., 1973).

A medula óssea aplicada via percutânea, no ambiente da falha óssea, induz um processo de reparação precoce, por meio de ossificação intramembranosa e endocondral, que ocorre principalmente nas primeiras três semanas por formação óssea direta (BARROS, 2000).

O problema vital nessa questão permanece em encontrar um material que possa limitar a chance de infecção, permitir crescimento ou formação de osso novo, apresentar resistência estrutural, permitir reconstruções e servir de agente condutor para a medula óssea no local da implantação.

Esses métodos vêm sendo utilizados e aperfeiçoados, apresentando evolução e resultados consideráveis (SILVA, 2000). No entanto, a complexidade da

reparação de diferentes deformidades, tendo sua localização e dimensões como fatores determinantes (van PUTTEN e YAMADA, 1992), levou a busca da substituição tecidual por material “não vivo”, o que define o termo aloplasia ou aloplastia e que originou o surgimento dos aloplásticos ou alomateriais.

Nos anos recentes, problemas com antigenicidade, doenças infecto-contagiosas, suprimento ósseo de implante e métodos de estocagem, têm levado ao desenvolvimento de uma variedade de materiais artificiais de substituição.

Os biomateriais (materiais artificiais desenvolvidos para uso biomédico) têm sido utilizados como opção para o preenchimento de defeitos ósseos segmentares. Nos últimos anos, a pesquisa dos biopolímeros ganhou grande impulso, com diversas aplicações nas áreas de implantes odontológicos, cardiovasculares e outras (CHIERICE, 1994).

Com a crescente conscientização da preservação e aproveitamento controlado de produtos naturais, com conseqüente diminuição da toxicidade dos produtos obtidos a partir desta biomassa, a síntese de resinas poliuretanas tem conquistado grande espaço de pesquisa. A mamona (*Ricinus communis*), constitui um vegetal típico de clima tropical e o Brasil, por sua grande extensão territorial, apresenta-se como uma das maiores reservas mundiais deste produto (IGNÁCIO, 1995).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar, através de estudos radiológicos, morfológicos e da análise histológica com microscópio de luz e de fluorescência, as características do processo de reparação óssea e o comportamento do polímero vegetal extraído de óleo de mamona, adicionado de carbonato de cálcio, isoladamente e associado a impregnação com medula óssea autógena, aplicado em sítio heterotópico e na reparação de falhas ósseas experimentais em rádio de coelhos, em diferentes tempos de evolução.

Nestes aspectos, os polímeros são muito interessantes, pois apresentam composição e estrutura que podem ser trabalhadas conforme necessidades específicas, proporcionando uma grande flexibilidade de desenhos e, em alguns casos, sendo biodegradáveis (YASZEMSKI et al., 1996). Além disso, muitos apresentam biocompatibilidade, adesão celular relativamente alta, crescimento celular

e manutenção da atividade de osteoblastos cultivados sobre eles (SAAD et al., 1996).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Poliuretana Derivada do Óleo de Mamona

A mamona (classe Dicotiledônea, ordem *Geraneales* e família *Euphorbiaceae*) é um vegetal típico do Brasil e seu óleo é conhecido como óleo de rícino ou “castor oil”, contendo 89% do triglicerídeo do ácido ricinoleico, caracterizando-se estruturalmente como um poliéster, possuindo três moléculas do ácido 12-hidroxi-oleico (ou ricinoleico), sendo que cada uma delas apresenta um grupo hidroxila no carbono 12 (IGNÁCIO, 1995).

A reação de pré-polimerização para a formação da poliuretana é feita entre um di-isocianato e um poliol, de maneira a deixar grupos isocianatos livres no produto final. O pré-polímero é um líquido viscoso com menos reatividade do que o di-isocianato da partida. Já a reação de polimerização final com o pré-polímero para a formação da poliuretana pode ser feita com um diol, diamina ou ainda um poliol (IGNÁCIO, 1995).

Os polióis utilizados na síntese de poliuretanas contêm dois ou mais radicais hidroxilas, apresentando-se geralmente na forma de poliéster e poliéter (IGNÁCIO, 1995).

A poliuretana avaliada neste estudo é derivada de um poliéster sintetizado a partir do óleo de mamona e difenilmetanodiisocianato, sendo composta pelos seguintes componentes:

1. carbonato de cálcio (tem a finalidade de aumentar o volume da mistura, permitir a formação de poros, evitar a formação de bolhas e estimular a

biointegração);

2. pré-polímero derivado do difenilmetanodiisocianato e poliálcool poliéster;
3. poliálcool derivado do polímero poliuretano do óleo da mamona.

A fórmula molecular da poliuretana derivada do óleo da mamona apresenta fácil processabilidade, flexibilidade de formulação, controle de pico exotérmico na transição de pico líquido-gel, excelentes propriedades estruturais, ausência de emissão de vapores tóxicos, baixo custo e é biodegradável (IGNÁCIO, 1995).

Como é característica dos polímeros, a poliuretana derivada do óleo da mamona na forma não-calcificada apresenta especial plasticidade, podendo variar da consistência de gel à sólida. Como gel, pode atuar como um substituto para materiais como o teflon ou silicone (COSTA e SCHALL, 1992; OHARA, et al., 1995) e, na forma sólida, geralmente é associado ao carbonato de cálcio, que lhe proporciona porosidade (Figura 4, A, B e C), favorecendo a sua indicação como material de enxertia óssea (IGNÁCIO, 1995; OHARA et al., 1995; VILARINHO et al., 1996; CARVALHO et al., 1997; CLARO NETO, 1997). Segundo CLARO NETO (1997), o polímero pode ser processado sem carbonato de cálcio, mas a sua adição é que confere os melhores padrões de resistência e elasticidade em relação ao tecido ósseo, além de fornecer cálcio na região da interface osso/polímero, quando este é implantado, estimulando assim a biointegração. Os ensaios mecânicos mostraram que este mineral em quantidades de até 40%, melhora suas propriedades mecânicas. Análises de microscopia eletrônica de varredura comprovaram a existência de bolhas no polímero, que foram preenchidas pelo carbonato de cálcio.

Segundo os fabricantes do “composto ósseo de ricinus” o produto é atóxico, germicida, bactericida e esterilizante (Poliquil Araraquara®, 2001).

2.2. Aloplásticos

Biomateriais, biopolímeros, implantes ou aloplásticos são designações comuns aos materiais sintéticos e semi-sintéticos, desenvolvidos para uso temporário ou definitivo em organismos vivos. Os sintéticos são constituídos de materiais artificiais inertes, implantados com a finalidade de aumento, substituição e reparo

ósseos. Durante o mecanismo de reparo, podem permanecer no local como material de preenchimento, serem reabsorvidos com simultânea osteogênese ou servirem de matriz para a deposição de tecido ósseo. Muitos materiais têm sido utilizados, entre eles: metais, cerâmicas, ligas de carbono, fosfatos de cálcio (hidroxiapatita e fosfato tricálcico) e biopolímeros (BISSADA e HANGORSKY, 1980; BERNARD, 1991). Estes materiais podem ser bioinertes, não se unindo diretamente ao osso, ou bioativos, devido à forte união química na interface material/osso.

A presença de osso dentro dos poros do material implantado é evidência de que ele possui propriedades osteocondutoras, ou seja, permite o crescimento ósseo dentro de sua estrutura quando esta é colocada junto ao osso. Se, por outro lado, a formação de osso ocorre quando o implante é colocado em tecido mole, evidenciando a diferenciação celular, então ele é dito osteoindutor (WHITE e SHORS, 1986; van EEDEN e RIPAMONTI, 1994; SILVA, 2000).

O insucesso representado por fratura e infecção, quando materiais aloplásticos são usados como substitutos ósseos, tem sido atribuído ao fato de serem isentos de tecido vivo (SCHLIEPHAKE et al., 1995). Já que o sucesso da substituição óssea por osso alógeno ou materiais aloplásticos depende da capacidade destes em provir suporte à penetração de tecido ósseo vital, determinando a osteointegração, várias associações têm sido feitas na tentativa de somar propriedades desejadas e acelerar o processo de reparação (OLIVEIRA et al., 2000; SILVA, 2000).

Um modelo experimental, com a finalidade de verificar a neoformação óssea e integração do cimento derivado da poliuretana de mamona no preenchimento de falhas ósseas, foi desenvolvido por IGNÁCIO (1995). Foram produzidas falhas osteoperiosteais em rádio de coelhos. A análise dos resultados demonstrou que, apesar da membrana intra-óssea potente e de um forte sistema ligamentar que une o rádio e a ulna, todos os segmentos do grupo controle apresentaram perda do alinhamento do membro (deslizamentos epifisários e fraturas), ao contrário dos antebraços onde a falha óssea produzida foi preenchida com o cimento, que suportaram bem as forças mecânicas exercidas pela marcha normal. O autor observou formação gradual e progressiva de osso novo a partir das interfaces resina-osso proximal e distal, em direção à região central, iniciando-se por um processo

inflamatório decorrente da agressão produzida pelo ato cirúrgico, que diminuiu paulatinamente. No grupo de avaliação mais longo (16 semanas), a formação fibroblástica foi substituída por lamelas ósseas, que se uniram na região central do cimento, com formação de camada cortical delgada e um esboço de canal medular. Não foi observado crescimento ósseo através dos poros da resina, mas apenas em sua superfície, com os poros sofrendo compactação progressiva, não havendo fagocitose do material, presença de células gigantes do tipo corpo estranho e qualquer grau de toxicidade do material.

KHARMANDAYAN (1997) estudou a interface entre o osso e o pino de poliuretana em ossos de coelho, referindo ausência de crescimento ósseo no interior e na superfície do implante. Destacou sua biocompatibilidade, com ausência de fenômenos reacionais.

FRASCINO (1998) estudou o implante da resina de mamona em falhas ósseas produzidas na calota craniana de coelhos. As avaliações macroscópicas, radiológicas e histológicas dos defeitos dos animais do grupo controle mostraram reparação por tecido cicatricial, com formação de uma membrana fibrosa no local. Os animais que receberam o polímero apresentaram, às 6 semanas, formação de osso novo reparando o defeito em suas extremidades. A partir deste período, observou-se uma fragmentação irregular e progressiva da resina implantada, acompanhada de deslocamento de seus fragmentos nos casos mais tardios, permitindo a ocorrência de osteogênese e osteocondução, com osso novo reparando satisfatoriamente as falhas produzidas. Para o autor, os implantes exerceram um “efeito membrana” nos leitos de implantação, isolando a área de implantação e permitindo o crescimento, cujo processo foi denominado osteopromoção. Não foi evidenciada atividade fagocitária, com os implantes não sendo incorporados até 24 semanas, embora tenha sido considerada a possibilidade da ocorrência de degradação metabólica dos implantes. Não foram observados fenômenos tóxicos, nem propriedades osteoindutoras nos implantes.

RAMALHO (1998) utilizou o implante de polímero em mandíbula de ratos, verificando biocompatibilidade, formação de osso novo e ausência de osteoindução.

2.3. Biocompatibilidade e Resposta Inflamatória

Um material é biocompatível quando, em contato com o tecido vivo, não interage negativamente com o sistema de defesa do hospedeiro, não é tóxico aos tecidos vizinhos, não é carcinogênico, não causa hemólise ou destruição das células sanguíneas e não libera substâncias nocivas que possam afetar outros órgãos (IGNÁCIO, 1995).

Todos estes fatores podem estar relacionados com o desencadeamento de uma resposta inflamatória, mas é importante ressaltar que uma pequena inflamação pode ser considerada benéfica, principalmente quando a reabsorção do material é desejada (PELUSO et al., 1994).

COSTA et al. (1992) testaram a biocompatibilidade da poliuretana de mamona colocada em tubos de polietileno, implantados no dorso de ratos. O material promoveu moderada reação inflamatória com predomínio de células mononucleares, novos vasos sanguíneos e degradação do colágeno. Com o decorrer do tempo, foi notada regressão dos eventos inflamatórios e reparação junto à abertura dos tubos. Aos 30 e 60 dias, um tecido conjuntivo fibroso denso, com características histológicas de normalidade envolvia o tubo de polietileno.

OHARA et al. (1995); IGNÁCIO (1995); VILARINHO et al. (1996); CARVALHO et al. (1997) e KHARMANDAYAN (1997) concluíram que a poliuretana derivado do óleo da mamona, com e sem cálcio, comporta-se como um material biocompatível. E a biocompatibilidade da poliuretana derivada da mamona pode ser explicada pela alta pureza de sua constituição (CHIERICE, 1994), não contendo solventes, detritos, estabilizadores e produtos de degradação, responsáveis por respostas orgânicas adversas (MARCHANT et al., 1986).

MARCHANT et al. (1986) consideraram a interação de leucócitos com biomateriais um fator crucial na determinação da biocompatibilidade, já que em função dessa interação, os leucócitos seriam hábeis para liberar ou estimular muitos mediadores responsáveis pela intensidade e duração da resposta inflamatória. Sugerem ainda que esses eventos podem ser variáveis em função da química e superfície do polímero.

ZHAO et al. (1990) concluíram que a interação celular na interface

tecido-biomaterial é um dos fatores mais importantes para determinar a bioestabilidade e, conseqüentemente, biocompatibilidade. Já SAAD et al. (1996) destacaram a interação celular, em particular a resposta inflamatória e a citotoxicidade aos prováveis produtos de metabolização, como os mais importantes fatores determinantes da biocompatibilidade de biomateriais.

Entre os fagócitos, os macrófagos têm atraído maior atenção nas pesquisas biomédicas, por possuírem vida longa e preferencial aderência por biomateriais (ANDERSON e MILLER, 1984; MARCHANT et al., 1986; ZHAO et al., 1990), e acredita-se que são responsáveis pela metabolização de polímeros *in vivo* (ZHAO et al., 1990; PELUSO et al., 1994).

Células fagocíticas, como o macrófago, atuam por adesão e propagação sobre a superfície de um implante polimérico. Como os macrófagos são muito pequenos em relação à superfície do polímero, fundem-se, dando origem a células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, na tentativa de digerir e degradar o material estranho (SUTTON e WEISS, 1966; MARCHANT et al., 1986).

OHARA et al. (1995) estudaram a biocompatibilidade da poliuretana de mamona em coelhos. O corpo-de-prova em forma de gel foi implantado intra-articularmente no joelho esquerdo e o calcificado, em forma de cilindro de 0,5 cm, no côndilo medial do joelho direito. Os autores concluíram que a resina não é tóxica, não produz reação inflamatória tardia da membrana sinovial, nem crescimento bacteriano nas culturas do líquido sinovial e, quando implantada no osso, foi revestida por uma fina cápsula fibrosa, sem infiltrado inflamatório e, em alguns pontos, houve crescimento ósseo em íntimo contato com o polímero de mamona. Não houve crescimento ósseo no interior dos poros dos implantes e estes não sofreram reabsorção. Os implantes permaneceram no interior do tecido ósseo e não foram expostos às forças musculares ou trauma. Assim sendo, os autores advertiram que os resultados do estudo não podem ser extrapolados para casos em que se faz uso do polímero em próteses ortopédicas submetidas a carga mecânica ou em áreas de ação muscular.

2.4. Osteocondução na Regeneração Óssea

O termo osteocondução aplica-se ao processo observado quando estruturas porosas são implantadas no osso ou adjacentes a ele. Capilares, tecidos perivasculares e células osteoprogenitoras migram entre os espaços porosos e incorporam esta estrutura como novo osso formado. O processo é caracterizado por um crescimento inicial de tecido fibrovascular que invade a estrutura porosa, o qual é seguido por uma deposição de osso novo diretamente sobre ela. O início do processo não depende da presença da estrutura porosa e o substrato osteocondutor age como um arcabouço passivo cuja presença direciona o crescimento interno de osso e de tecido fibrovascular (CORNELL e LANE, 1998).

O entendimento atual de osteocondução sugere que o processo requer porosidade e segue os mesmos princípios observados durante o reparo da fratura e remodelação óssea. A alta concentração de CaPO_4 ao redor do implante osteocondutor estimula a deposição de osso novo ou cristais de CaPO_4 , por estimular a reabsorção osteoclástica do implante. A ativação da reabsorção osteoclástica estimula a formação osteoblástica de osso novo, através de um processo de reabsorção/formação ósseas (CORNELL e LANE, 1998).

O implante precisa ser mecanicamente estável, com micromovimentos mínimos e sem formar saliências ou reentrâncias com o osso. É incorreto considerar a osteocondução como um processo puramente passivo. A porosidade e a estrutura química são importantes, pois uma superfície de fosfato de cálcio que pode ser remodelada favorece o crescimento ósseo para o implante. A presença de colágeno aumenta a cristalização e permite a ligação de proteínas não colágenas e fatores de crescimento (RIPAMONTI, 1991).

Biomateriais têm sido desenvolvidos na forma de membrana com a finalidade de promover a “regeneração tecidual orientada”, ou seja, a membrana é posicionada abaixo do tecido mole e em contato com as bordas do defeito ósseo, permitindo a osteogênese em um ambiente isolado, excluindo células competitivas do tecido epitelial e conjuntivo (DAHLIN et al., 1989; CAFFESSE e BECKER, 1991). Esta técnica geralmente é associada a materiais de enxertia óssea na forma de grânulos ou blocos (SCHLIEPHAKE et al., 1994).

CORNELL e LANE (1998) observaram que, para ocorrer a osteocondução no interior de sua arquitetura, o implante deve apresentar poros com interconexões em sua estrutura trabecular e permitir o crescimento interno dos tecidos vizinhos. Observaram também que a osteocondução parece ser potencializada nos materiais que não somente apresentam estrutura física similar à do osso, como também composição química semelhante a do tecido ósseo.

Com respeito a interface implante/hospedeiro, a formação de uma cápsula fibrosa circundando o implante, de acordo com WEISS (1986), deveria ocorrer preferencialmente somente nas fases iniciais de sua aplicação. Quando ocorre reação fibrosa ao invés de proliferação celular osteoblástica, pode significar instabilidade mecânica ou rejeição biológica (HOLMES et al., 1986).

2.5. Aplicações da Medula Óssea Osteogênica

A osteogenicidade da medula óssea deve-se às células osteoprogenitoras do estroma (ASHTON et al., 1980), que, segundo TAKAGI e URIST (1982), contém dois tipos celulares: as células precursoras ósseas determinadas (DOPC) e as células precursoras ósseas indutíveis (IOPC), por necessitarem de fator indutível antes de determinar atividade osteogênica.

Para BURWELL (1985), DOPC é uma célula diferenciada para linha produtora de osso, presente apenas no estroma da medula e superfície óssea, enquanto IOPC é uma célula mesenquimal indiferenciada, *stem cell*, existente em todos os tecidos conjuntivos, e que responde a um estímulo local produzindo osso, como o que ocorre em fraturas e enxertos ósseos. Portanto, no processo de reparação óssea, células presentes na medula desempenham um papel importante na osteogênese ou fagocitose, dependendo das condições do meio.

Considerando que a reparação óssea é um processo dependente de resposta celular, a medula deve ser considerada como a fonte mais produtiva de células que influenciam a osteogênese. Além disso, quando usada por via percutânea, o fenômeno acontece de forma precoce, com maior intensidade na primeira e segunda semanas após a enxertia (BARROS, 2000).

OLIVEIRA et al. (2000) avaliaram o uso da matriz óssea homóloga desmineralizada associada a medula óssea autógena no preenchimento de falhas segmentares em rádio de coelhos e concluíram que houve aumento da capacidade de reparação com a associação das células do estroma medular.

Em pacientes portadores de sarcomas ósseos e sob quimioterapia com potentes inibidores da cura da fratura, injeções percutâneas de medula óssea feitas após ressecção em bloco da neoplasia e conseqüente desenvolvimento de não-união, mostraram ser de valor potencial (HEALEY et al., 1990). Segundo WERNTZ et al. (1996), isto demonstra que não é necessário ter osso traumatizado fresco com liberação de substâncias indutivas, uma vez que a medula possui suficiente capacidade osteogênica para formação óssea.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em 36 coelhos da raça Nova Zelândia brancos, com idade entre cinco e seis meses e peso entre 3 e 4 kg. O protocolo anestésico consistiu de medicação pré-anestésica com acepromazina¹ (0,2 mg/kg IV) e anestesia dissociativa com tiletamina/zolazepan² (15 mg/kg IV). Cada coelho recebeu penicilina benzatina³ (40.000 UI/kg IM) no momento da medicação pré-anestésica. Após a cirurgia, os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam ração comercial⁴ e água a vontade.

Foram utilizados “kits” estéreis, que continham uma ampola com o pré-polímero, uma ampola com o poliol e uma embalagem plástica contendo o carbonato de cálcio (Figura 3). Para a preparação do polímero, o carbonato de cálcio e o conteúdo da ampola de pré-polímero foram colocados em cuba de vidro e misturados com espátula estéril. A ampola de poliol derivado do óleo de mamona foi adicionada e a mistura foi homogeneizada por cerca de 5 a 8 minutos. A reação de polimerização da resina ocorreu em torno de 20 minutos.

O polímero preparado com 40% de carbonato de cálcio permitiu a confecção dos cilindros (Figura 4), com dimensões semelhantes às das falhas, que foram esterilizados em autoclave (120°C e 1,5 atm) e posteriormente implantados nas

¹ Acepran 1%, Univet.

² Zoletil, Virbac S.A.

³ Benzetacil, Wyeth.

⁴ Ração Coelhoil “R”, Socil.

falhas. Um ajuste adequado e a aproximação da musculatura mantiveram o polímero no lugar tornando desnecessário o uso de fixação interna ou externa.

A medula óssea foi obtida por aspiração percutânea da crista ilíaca dos coelhos durante o procedimento cirúrgico de implantação do polímero. A agulha para punção de medula óssea foi inserida na crista ilíaca posterior e rotacionada cuidadosamente até a cavidade medular. O mandril foi removido e a medula óssea foi aspirada com o auxílio de uma seringa de 20 ml, heparinizada⁵, permitindo a coleta de cerca de 1,0 ml, que foi colocado sobre o implante, já no leito receptor, impregnando-o totalmente, imediatamente após a coleta.

A falha óssea foi criada cirurgicamente, em ambos os rádios, pela remoção de um segmento osteoperiosteal em todo o seu diâmetro, com 1,5 cm de comprimento, localizado a 2,5 centímetros da articulação rádio-cárpica, por intermédio de serra elétrica circular⁶, segundo técnica preconizada por HEIPLE et al. (1963). A estabilização do rádio não foi necessária devido a sinostose com a ulna. As extremidades da falha foram lavadas com solução fisiológica e o tecido muscular e subcutâneo foram aproximados com fio absorvível⁷ 3-0 e a síntese da pele foi feita com fio inabsorvível⁸.

Para avaliar o polímero vegetal extraído de óleo de mamona na reparação das falhas ósseas, foram utilizados 15 coelhos, numerados de 1 a 15, separados em três grupos experimentais iguais (P₁, P₂ e P₃) e para o polímero associado à medula óssea autógena foram utilizados 15 coelhos, numerados de 16 a 30, também separados em três grupos experimentais iguais (M₁, M₂ e M₃). Todos os animais foram sacrificados e o material para exames macro e microscópicos dos membros operados foram colhidos, conforme a Figura 1:

⁵ Heparina 5.000UI/ml, Ariston.

⁶ Regular double cutting (22,22mmx0,6mm) Dentorium New York – NY.

⁷ Catgut cromado, Brasmédica S.A.

⁸ Nylon cirúrgico, Farma Brasileira.

O tecido mole adjacente e dois polímeros implantados em sítio heterotópico em cada um dos seis coelhos foram coletados às 2, 4 e 6 semanas, respectivamente, processados histologicamente e examinados. No polímero, sob microscopia de fluorescência, foi avaliada a marcação pela tetraciclina⁹, que foi aplicada por três dias consecutivos, na dosagem de 30 miligramas por quilo de peso corporal, por três dias consecutivos, até 48 horas antes da coleta. À microscopia de luz, foi observada a presença de tecido osteóide ou osso novo.

Para avaliação histológica do tecido mole ao redor do polímero processado, foram considerados o infiltrado celular (celularidade e tipo de células) e presença ou não de lesão tissular (necrose).

A avaliação radiográfica foi realizada em radiografias convencionais¹⁰, obtidas na incidência mediolateral dos membros tratados e controle, realizadas no dia 1 (dia da enxertia) e nos dias 7, 15, 42 e 63 após as cirurgias. Foram avaliadas a interface osso/implante, a presença de calo e o comportamento do polímero na falha.

No tempo previsto em cada grupo, os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico e as regiões operadas foram avaliadas macroscopicamente, nos cinco coelhos, objetivando detectar a presença de tecido fibroso e aderência ao tecido mole, presença de osso na falha e o comportamento do polímero e do membro controle.

A rotina histológica foi realizada em três pares de ossos, em três animais de cada grupo experimental. Após fixação em formol 10% tamponado, os fragmentos ósseos foram descalcificados, incluídos em resina acrílica e submetidos a cortes longitudinais, envolvendo a área de enxertia e tecido ósseo remanescente proximal e distal, que foi corado por hematoxilina/eosina, azul de toluidina/borato de sódio e examinados a microscopia de luz.

Foram avaliados a integridade do implante, presença de osso novo formado, presença de reação fibrovascular e tipo de tecido na transição implante/osso.

Para o exame da marcação do crescimento ósseo pela fluorescência da tetraciclina, dois coelhos dos grupos P e M e subgrupos receberam 30 miligramas de

⁹ Terramicina injetável, Pfizer Ltda. Rio de Janeiro, RJ.

¹⁰ Filme 18x24. IBF-Medix.

tetraciclina por quilo de peso corporal por três dias consecutivos. A mesma aplicação foi repetida após o intervalo de uma semana. Os coelhos foram sacrificados 48 horas após a última aplicação, a área de implantação foi coletada e o material foi processado segundo técnica preconizada por VOLPON (1985).

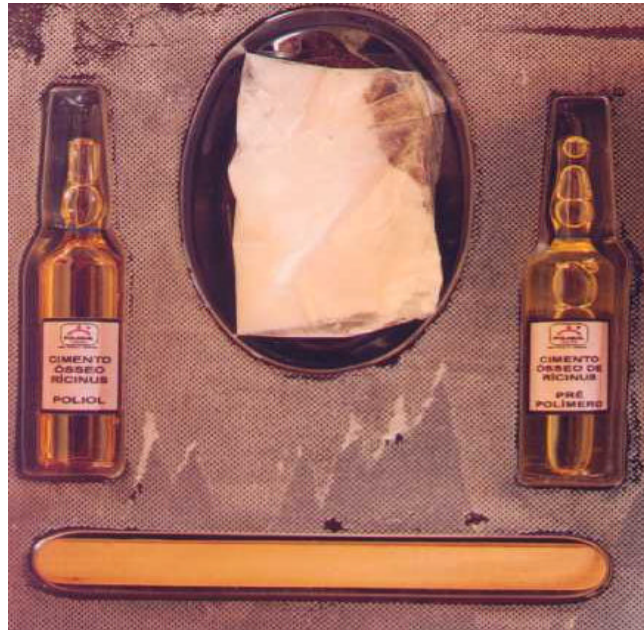


Figura 3. “Kit” estéril, contendo uma ampola com o pré-polímero, uma ampola com o polioli, uma embalagem plástica contendo o carbonato de cálcio e uma espátula de madeira.

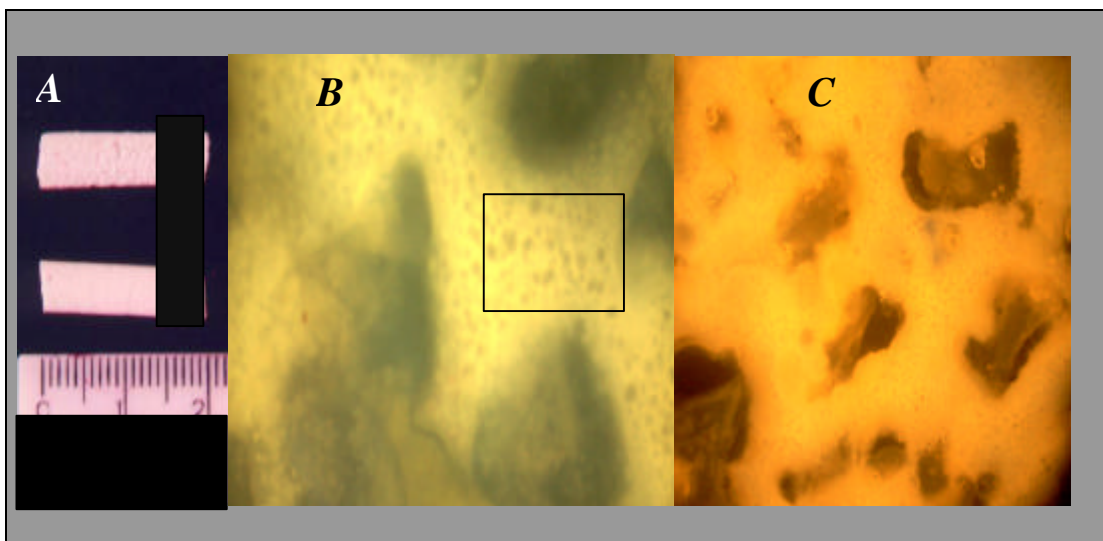


Figura 4. **A**. Cilindros de polímero, preparados com 40% de carbonato de cálcio, com as dimensões semelhantes às das falhas ósseas. **B** (100X). Aspecto microscópico do polímero, à microscopia de fluorescência, evidenciando a formação porosa. **C** (400X). Detalhe de **B** (quadrado).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação radiográfica

A avaliação radiográfica do polímero, no pós-operatório imediato, em todos os grupos, demonstrou aspecto homogêneo e poroso, porém com menor radiopacidade em relação à estrutura óssea receptora (Figura 5 A). Já nos membros controle, a imagem da área de osteotomia definia a falha óssea sem preenchimento (Figura 5 B).

Na primeira e segunda semanas, os membros que atuaram como grupo controle da pesquisa, na quase totalidade das radiografias, demonstraram pontos radiopacos na extremidade das falhas e distribuídos de forma irregular e escassa. Nas semanas seguintes (6 e 9), os pontos de radiopacidade ficaram mais visíveis, ocupando uma área maior, predominantemente nas porções mais periféricas da falha, caracterizando atividade osteogênica nas linhas de osteotomia. O aspecto radiográfico era de tecido ósseo maduro, com esclerose óssea e reabsorção e concomitante proliferação nas bordas da falha. Em quatro coelhos (27%) observou-se desvio dos fragmentos proximal e distal do rádio.

Na avaliação radiográfica dos ossos que receberam o implante do polímero sem concomitante aplicação de medula óssea (grupo P), foram observadas áreas irregulares de radiopacidade sobre o polímero e ocupando o defeito em suas porções periféricas às 3 semanas (Figura 6). Em 100% dos animais, a interface polímero/osso receptor encontrava-se radiotransparente nas radiografias iniciais e foi ganhando radiopacidade nas avaliações posteriores; as áreas de proliferação óssea foram mais intensas a partir do perióstio receptor distal (Figura 7), sendo freqüente a participação do perióstio da ulna, o que conferia aumento da radiopacidade local, principalmente, quando pôde ser observado deslocamento do implante (Figura 8).

Não foram observados reabsorção das extremidades receptoras do implante ou desvio dos fragmentos ósseos.

A avaliação dos ossos que receberam o implante do polímero associado a medula óssea (grupo M) demonstrou um padrão de radiopacidade mais intenso, mais regular e mais precoce, quando comparado ao grupo P. Estas condições foram progressivas em relação ao tempo, observando-se focos de radiopacidade sobre o polímero e em sua superfície e proliferação periosteal, significativamente maior a partir do perióstio que revestia o fragmento distal do rádio (Figuras 9 e 10). A partir da segunda semana, o perióstio da ulna apresentou-se mais radiopaco sob o polímero em 80% dos animais e quando foi detectado deslocamento do implante em radiografias subseqüentes, estes pontos de radiopacidade ficaram mais evidentes e podem ter contribuído para o deslocamento.

Em um coelho do grupo M, a partir da primeira semana, foram observados pontos de radiopacidade no polímero e ao seu redor, que evoluíram com o decorrer do tempo, com a interface permanecendo radioluscente até a terceira semana. Na sexta semana havia continuidade da radiopacidade na região da interface e na nona semana havia continuidade de uma linha semelhante a cortical, entre o osso receptor e o implante, tanto proximal quanto distal, formando uma imagem semelhante a um canal medular (Figura 11 A a D).

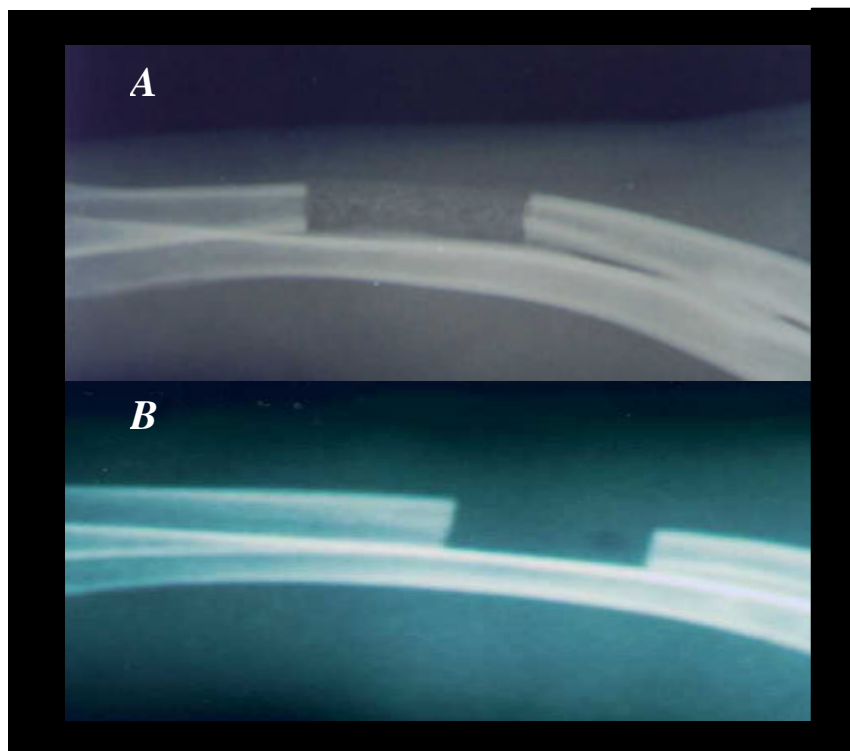


Figura 5. **A.** Radiografia pós-operatória imediata do rádio operado, demonstrando aspecto homogêneo e poroso do polímero, porém com menor radiodensidade em relação à estrutura óssea receptora. **B.** Membro controle, demonstrando radiotransparência total da área da falha óssea.

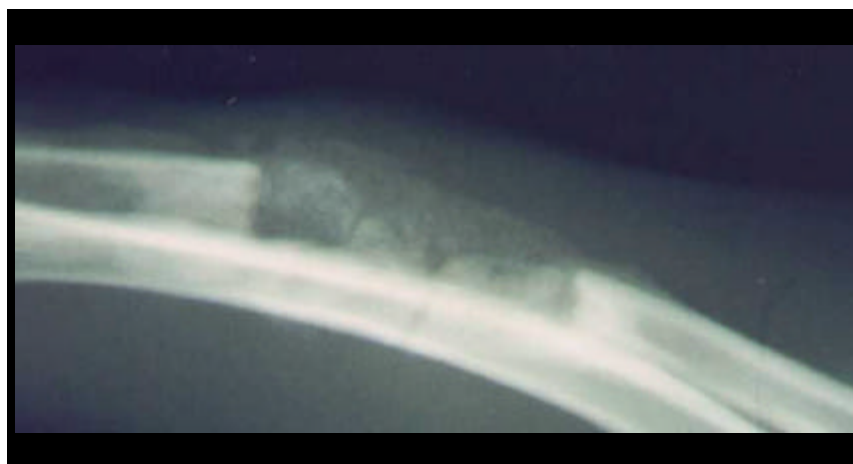


Figura 6. Radiografia da falha óssea de animal do grupo P, às três semanas. Áreas irregulares de radiopacidade ocupando o defeito em suas porções periféricas e na região do polímero.

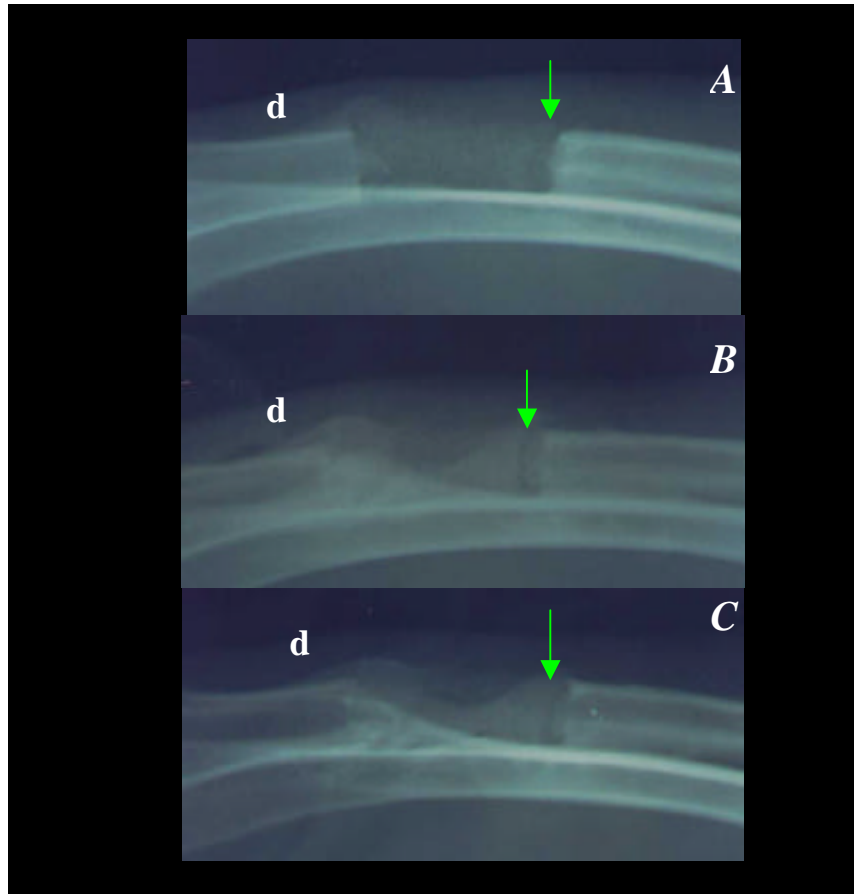


Figura 7. Radiografias A, B e C, às 3, 6 e 9 semanas, respectivamente, de um animal do Grupo P. Interface polímero/osso receptor radiotransparente (seta) e áreas de radiopacidade mais intensas a partir do perióstio receptor distal (d).

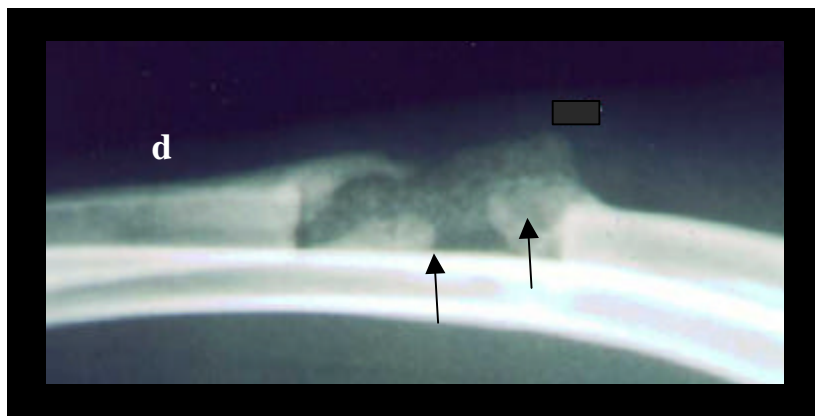


Figura 8. Radiografia da área operada, às 9 semanas de um animal do grupo P. Participação do perióstio da ulna, conferindo radiopacidade local e deslocamento do implante (setas). Proliferação óssea a partir do perióstio distal (d).

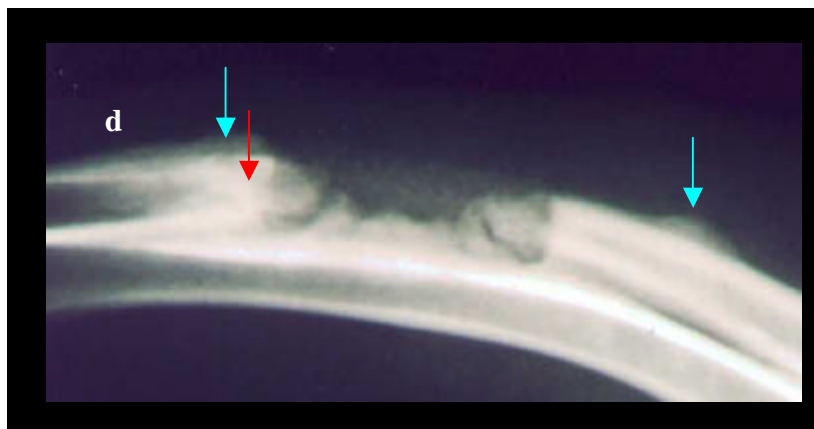


Figura 9. Radiografia da área operada de animal do grupo M, às seis semanas. Focos de radiopacidade na região do polímero e proliferação periosteal (setas azuis) proximal e distal (d), área de esclerose distal (seta vermelha).

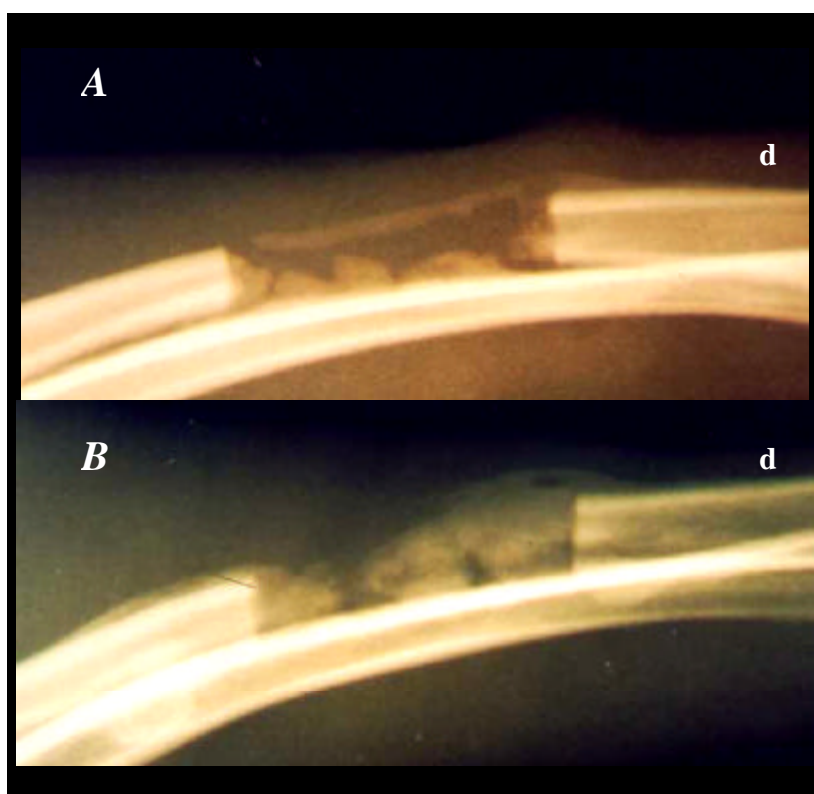


Figura 10. Radiografias da área operada, de animal do grupo M. A, 3 semanas e B, 6 semanas. Padrão de radiopacidade progressivo em relação ao tempo, observando-se áreas radiopacas na região do polímero e proliferação periosteal, a partir dos periósteos dos fragmentos proximal e distal (d) do rádio.

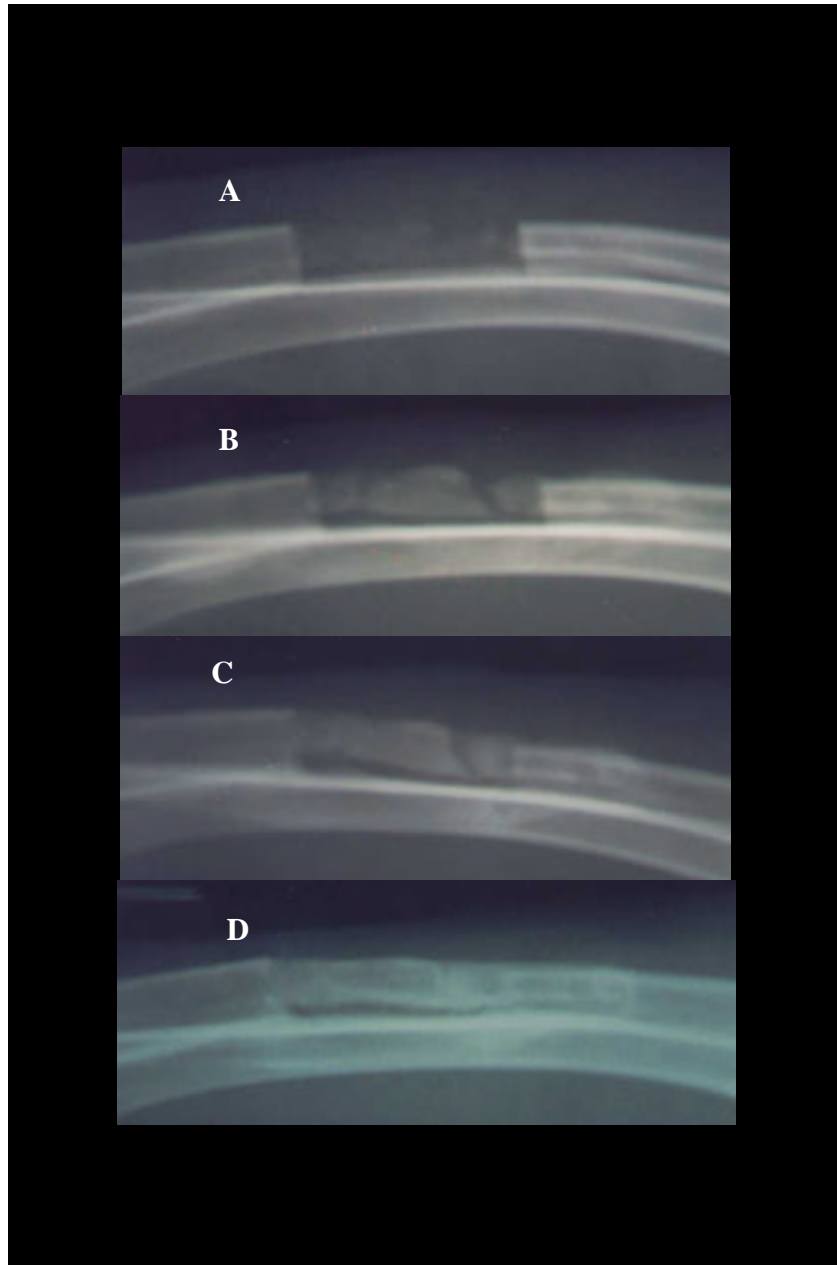


Figura 11. Radiografia da região operada, coelho número 4, grupo M. Radiopacidade na região do polímero (A, primeira semana), que se tornou mais intensa em radiografias seriadas (B, C e D, 3, 6 e 9 semanas, respectivamente).

4.2. Avaliação macroscópica

Nos raios controle, tanto no grupo P quanto no M, foi possível identificar a região da falha em todos os espécimes. O tecido que preenchia parcial ou totalmente a falha tinha aspecto de tecido fibroso ou ósseo.

No raios controle e nos que receberam implantes, foi observada a presença de tecido fibroso envolvendo a área de implantação, e a quantidade deste tecido diminuiu dentro dos grupos com o tempo de avaliação. Não houve formação de aderências ao tecido adjacente e em 94% dos espécimes o polímero encontrava-se na região de implantação.

4.3. Avaliação microscópica

4.3.1. Grupo Controle

Na quase totalidade dos raios controle, observou-se atividade osteogênica nas linhas de osteotomia, com discreta formação óssea. Com a progressão do tempo, as bordas do defeito apresentaram tecido ósseo maduro.

Foi observada presença de fibroplasia progressiva na área da falha, associada a tecido ósseo imaturo com presença de fibroblastos e colágeno, mais abundantes quanto mais tardia era a avaliação. A reparação completa da falha, quando presente, aconteceu de forma desorganizada.

4.3.2. Grupo P

O polímero estava íntegro nos animais deste grupo, aos 21 dias (P₁). Apresentava-se com poros de vários tamanhos, envolto por tecido fibroso, com infiltrado inflamatório moderado, sem indícios de reabsorção e com transição implante-osso relativamente bem ajustada. Em alguns espécimes, entre o tecido ósseo e o material implantado foi observada moderada faixa de tecido conjuntivo, exibindo feixes de fibras colágenas e crescimento ósseo imaturo (Figura 12). Na totalidade das amostras foi observada reação proliferativa a partir do perioste receptor.

Aos 42 dias (P₂) o crescimento ósseo observado foi discreto e restrito a áreas periféricas e ao perioste da ulna sob o polímero, havendo algum crescimento pelos poros do implante. Houve presença de tecido ósseo novo proliferando

principalmente a partir do periosteio e neovascularização e células gigantes multinucleadas (Figura 13 B).

Aos 63 dias (P₃) observou-se progressão da proliferação óssea sobre e entre os poros do polímero implantado, principalmente a partir dos fragmentos receptores. Foram observados pontos de calcificação na superfície e interior do polímero, nos cortes longitudinais superficiais. Não foi observada reação inflamatória na área do implante, nem sinais de reabsorção do polímero. Observou-se o envolvimento do polímero por tecido fibroso (Figura 13 A), com preenchimento dos poros superficiais por tecido fibroso e ósseo e a presença de neovascularização.

No exame da marcação óssea pela fluorescência da tetraciclina, foram observadas pequenas áreas de fluorescência próximas ao periosteio receptor, caracterizando osso imaturo (Figura 14).

4.3.3. Grupo M

Nas avaliações seriadas (M₁, M₂ e M₃), na maioria das amostras foi observada fibroplasia moderada na transição implante-osso com pontos de formação óssea. Em todas as amostras observou-se formação óssea com tendência a recobrir toda a falha a partir de suas bordas e sobre o implante.

A formação de osso novo, em todas as amostras, ocorreu principalmente a partir do periosteio do rádio receptor e do periosteio da ulna. A formação observada sobre o implante aconteceu a partir de brotos de tecido ósseo (Figura 17 A e B).

A superfície do polímero estava mais compacta nas observações seriadas e em alguns espécimes foi observada permeação do implante por trabéculas ósseas e tecido fibrovascular.

Foi observada fibroplasia variável (leve a moderada) na transição implante-osso, nas áreas em que não foi evidenciado crescimento ósseo.

A fluorescência da tetraciclina evidenciou formação de tecido ósseo imaturo, principalmente nas extremidades do periosteio distal e brotos isolados de formação de osso novo, com tendência a formar anéis concêntricos, caracterizando osteons primários (Figuras 15 e 16). Ficou evidenciada a formação óssea ao redor do polímero.

4.3.4. Polímero implantado na região abdominal

4.3.4.1. Polímero isolado

Nas observações iniciais foi identificado discreto processo inflamatório na periferia do polímero, que estava ausente nas observações subseqüentes e envolvido por tecido fibroso.

Ao exame da marcação do crescimento ósseo pela tetraciclina, não foram observadas áreas de fluorescência.

4.3.4.2. Polímero associado à medula óssea

Nas observações iniciais foi identificado processo inflamatório agudo envolvendo o polímero, que estava ausente nas observações subseqüentes. Também ocorreu neovascularização e proliferação fibroblástica, com tecido conjuntivo fibroso envolvendo o polímero (Figura 13 C) e pelos poros do polímero (Figura 13 D). No interior do implante não havia células inflamatórias, somente grupos de hemácias em diferentes graus de degeneração

Ao exame de marcação do crescimento ósseo pela tetraciclina, não foram observadas áreas de fluorescência.

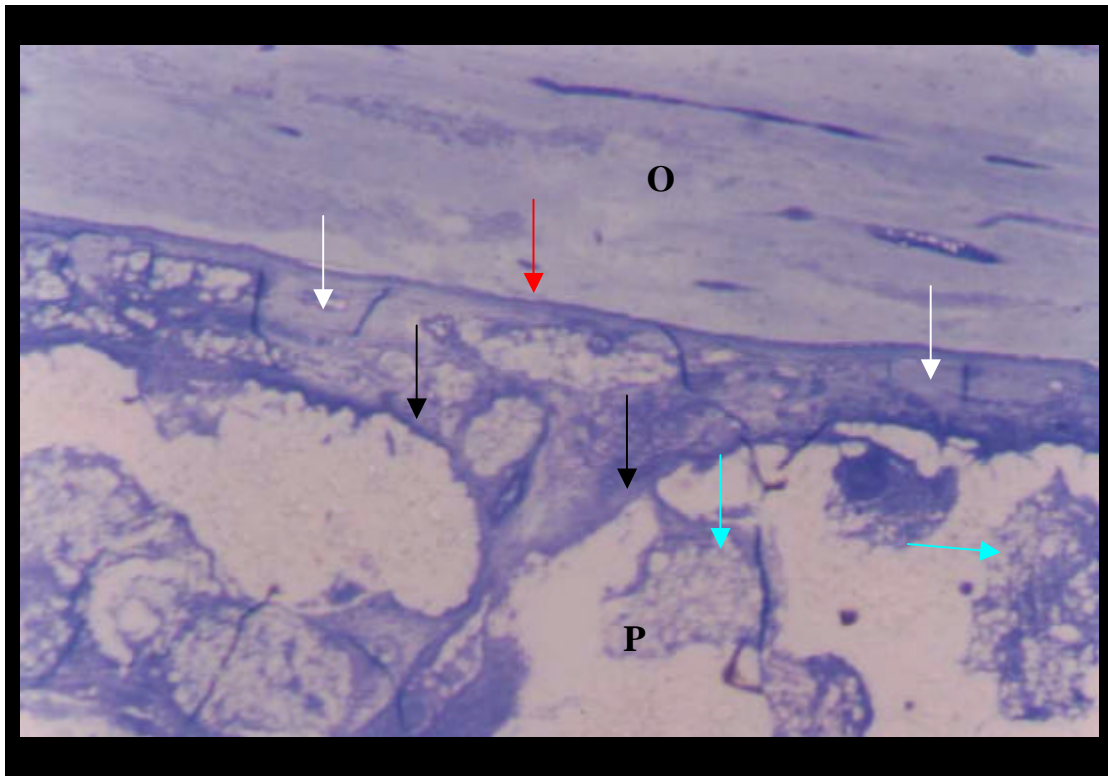


Figura 12. Interface polímero(P) /tecido ósseo (O). Proliferação do tecido conjuntivo fibroso (setas pretas) e crescimento ósseo imaturo (setas brancas), linha de cimentação (seta vermelha), tecido conjuntivo fibroso sobre o polímero (setas azuis). Grupo P, azul de toluidina, 400X. Grupo P aos 21 dias.

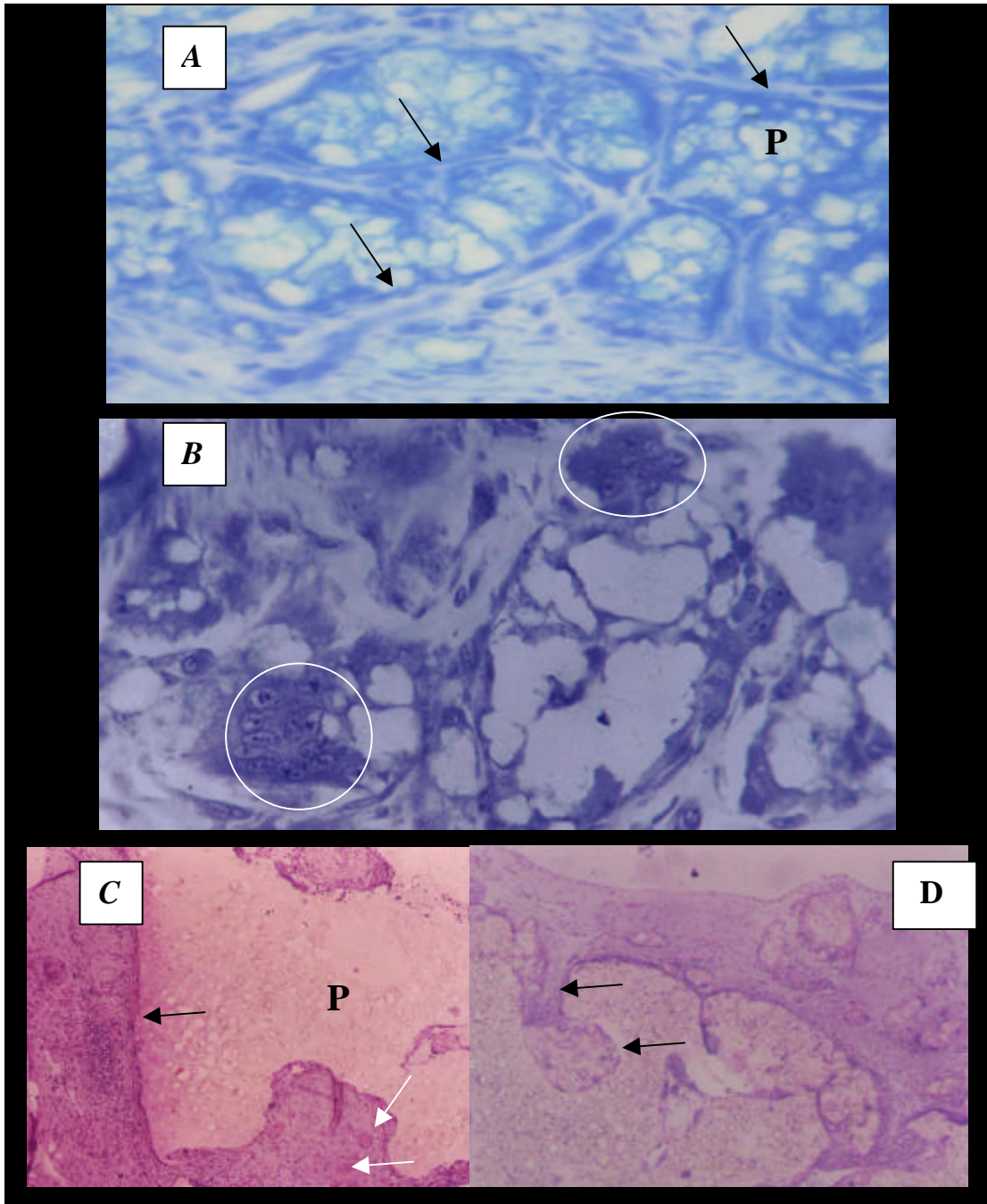


Figura 13. A. Polímero (P) envolvido por tecido fibroso (setas). Grupo P, 63 dias após a implantação. Azul de toluidina/borato de sódio. 200X. B. Células gigantes multinucleadas (círculos) nas proximidades do polímero implantado no rádio. Grupo P, 42 dias, Azul de toluidina/borato de sódio. 400X. C e D. Polímero associado a medula, implantado na região abdominal. Tecido conjuntivo fibroso (seta preta) envolvendo a periferia do polímero (P), formação de vasos novos (seta branca). HE, 200X. D. Tecido conjuntivo fibroso nos poros do polímero (setas). HE, 200X.

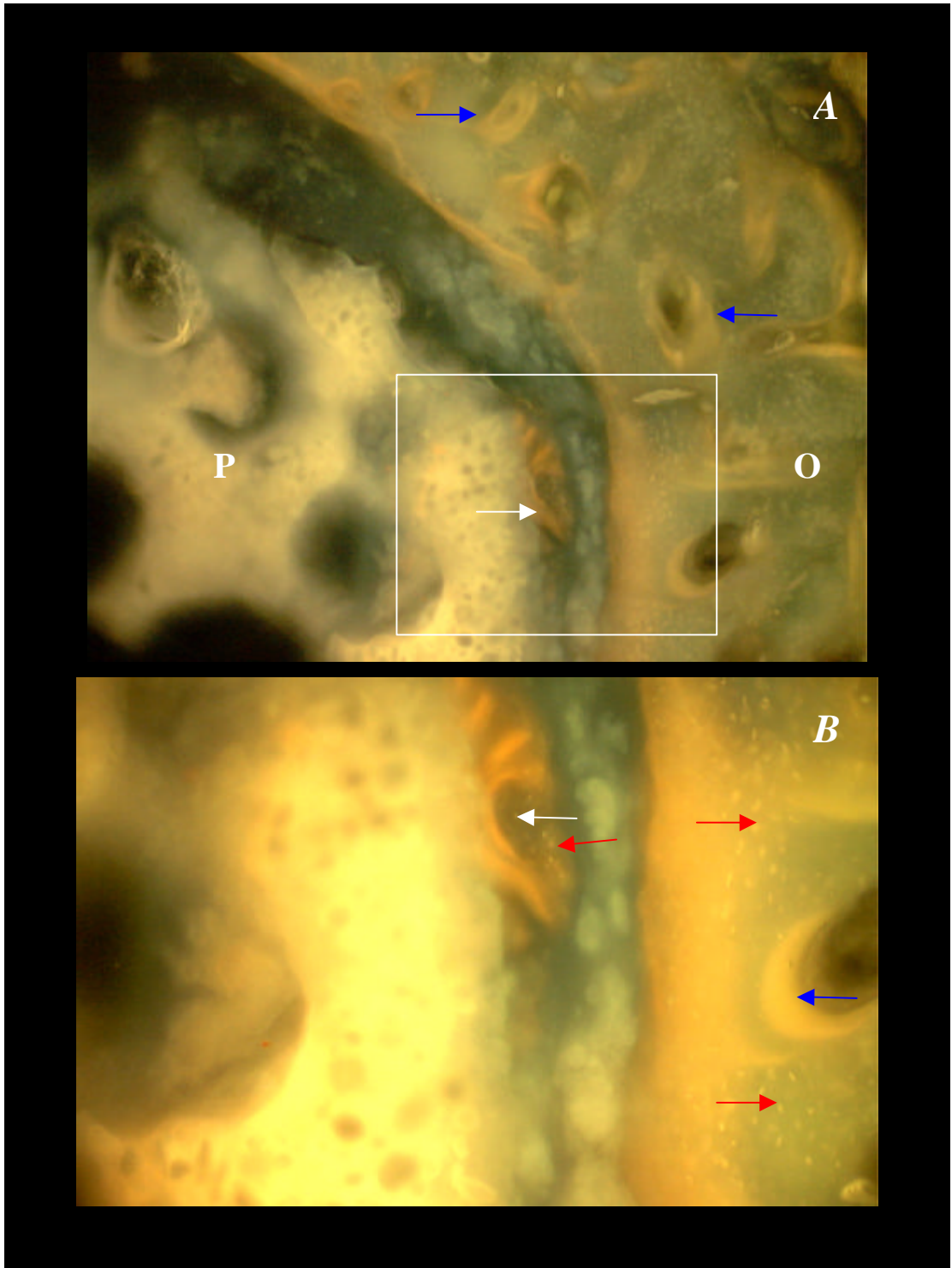


Figura 14. A. Interface polímero/tecido ósseo receptor (P/O), evidenciando reação de fluorescência com ósteons imaturos (setas azuis) a partir do receptor e em contato com o polímero (setas brancas). Lacunas osteocíticas (setas vermelhas).
B. Detalhe da área de A em destaque (quadrado). Animal do grupo P aos 63 dias.

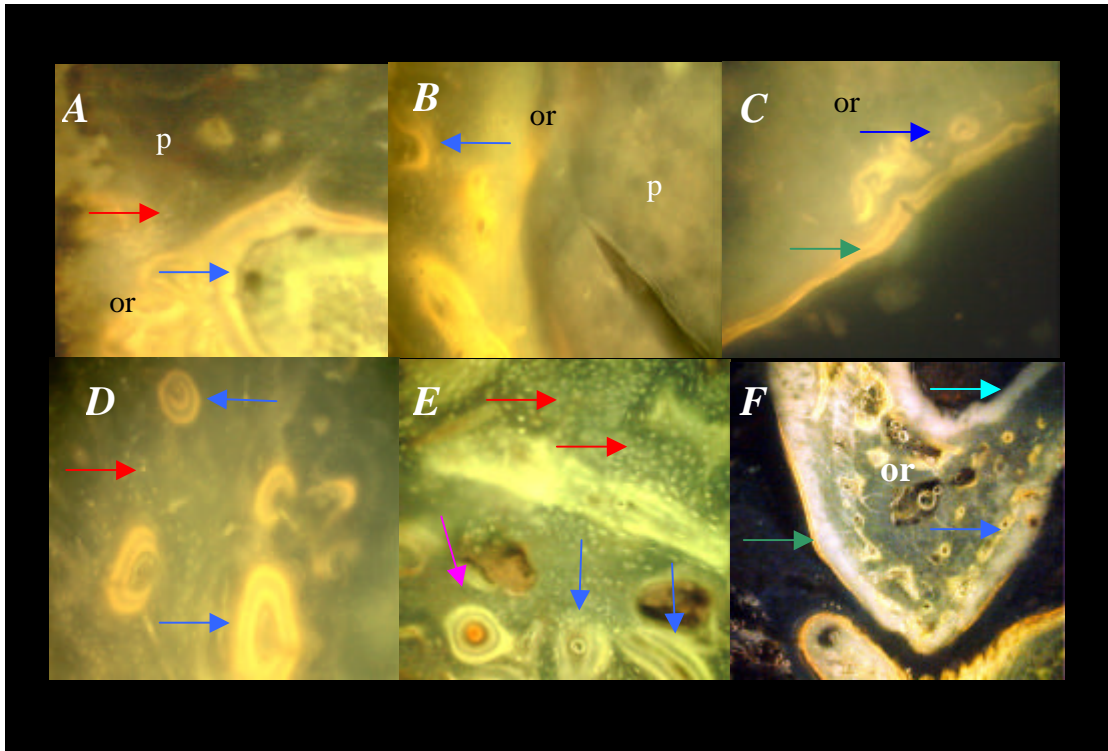


Figura 15. A e B. Fotomicrografias de fluorescência. Interface polímero (p) e osso receptor (or) evidenciando fluorescência na região de contato, caracterizando tecido ósseo imaturo, com tendência a formação de ósteons (setas azuis). Pontos brancos caracterizam lacunas osteocíticas (seta vermelha). C. Extremidade do osso receptor (or) demonstrando crescimento ósseo imaturo com tendência a formação de ósteons (seta azul). Fluorescência no perióstio fibroso (seta verde). D. Fotografia da extremidade do osso receptor demonstrando crescimento ósseo imaturo com tendência a formação de ósteons (seta azul) e lacunas osteocíticas (setas vermelhas). E. Região de interface caracterizando crescimento ósseo imaturo. Lacunas osteocíticas (setas vermelhas), ósteons imaturos (setas azuis), ósteons maduros (seta magenta). F. Aspecto do osso receptor (or) em corte transversal, evidenciando fluorescência no perióstio (seta verde), no endóstio (seta turquesa) e na extremidade receptora (seta azul). Espécimes do Grupo M.

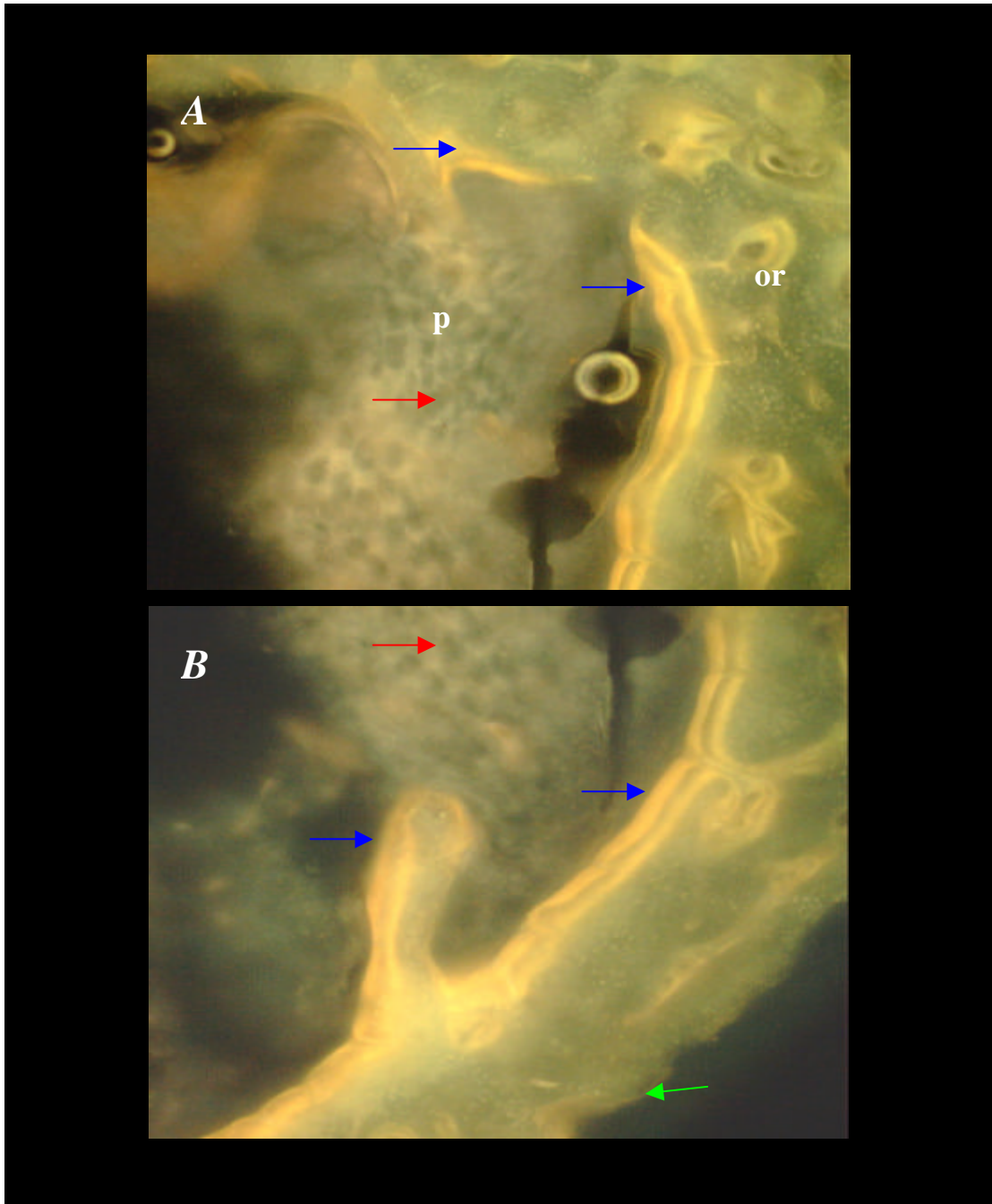


Figura 16. A. e B. Interface osso receptor (or) e polímero (p). Aspecto da formação óssea ao redor do polímero (setas azuis). Poros do polímero (setas vermelhas). Fluorescência do periósteo receptor (seta verde). Grupo M.

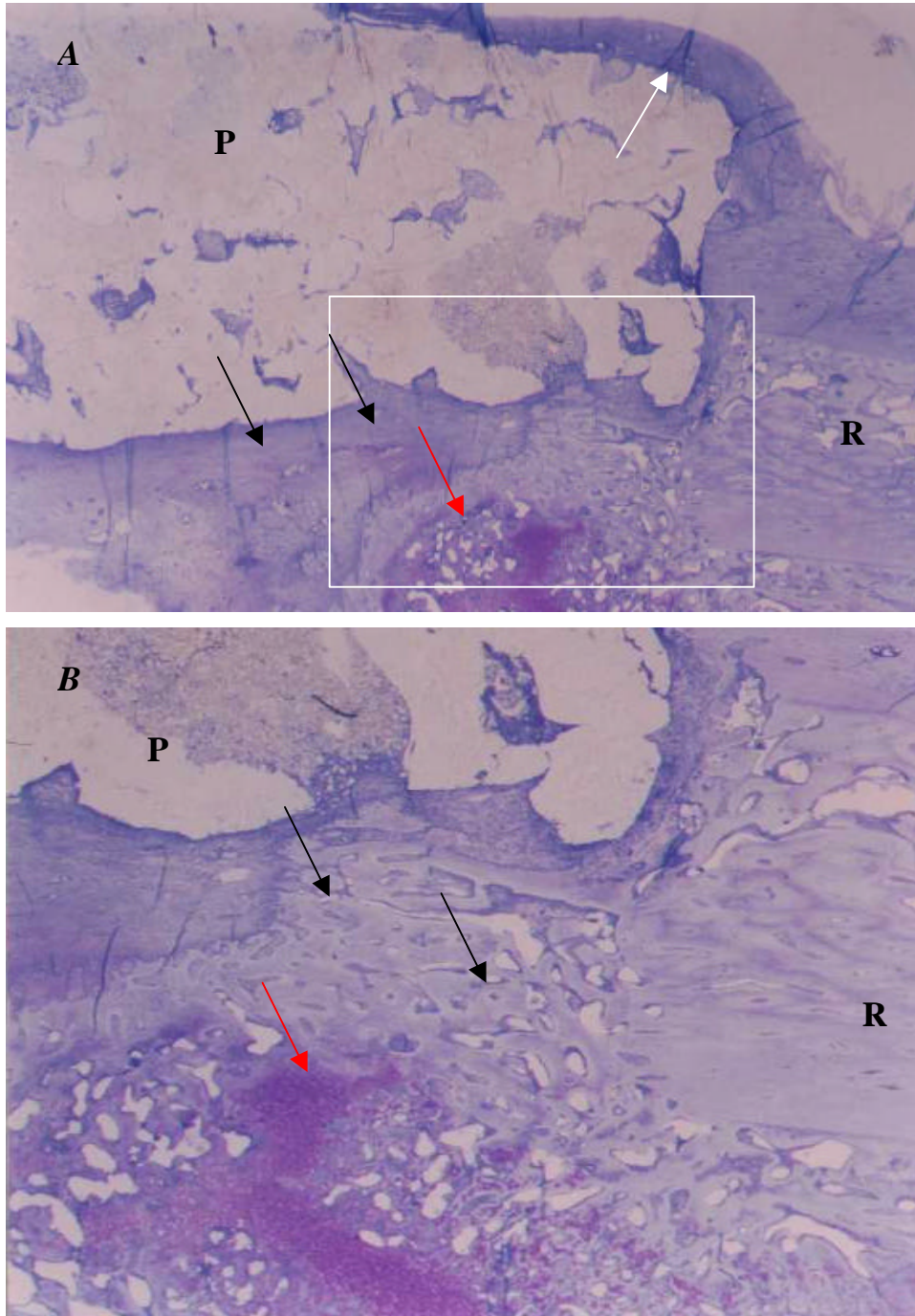


Figura 17. A. Formação de osso novo a partir do periósteo do rádio receptor (R). Formação óssea imatura sobre o implante (seta preta) e a partir de brotos de tecido ósseo/cartilaginoso (seta vermelha). Tecido conjuntivo fibroso (seta branca). Grupo M, 21 dias após a implantação. Azul de toluidina/borato de sódio 10X. B. Maior aumento da área em destaque (40X).

5. DISCUSSÃO

De maneira geral, as observações macroscópicas e histológicas demonstraram que a poliuretana vegetal utilizada foi biocompatível no período de avaliação do experimento. Apesar da presença de cápsula fibrosa e células gigantes ao redor do implante, não foram observados fenômenos reacionais adversos, assim como relataram COSTA et al. (1992), RAMALHO (1998), OHARA et al. (1995), IGNACIO (1995), KHARMANDAYAN (1997) e CARVALHO et al. (1997).

Os resultados foram semelhantes aos observados por OHARA et al. (1995), que realizaram a aplicação deste produto intra-ósseo e intra-articularmente em coelhos, e não observaram reação inflamatória tardia ou reações alérgicas. Provavelmente, nos períodos tardios, a fina cápsula fibrosa que revestia os implantes foi capaz de isolá-lo, o que histologicamente traduziu-se por ausência de infiltrado inflamatório.

O processo inflamatório observado, tanto no abdômen quanto na região da falha óssea, foi mais intenso nos períodos iniciais, provavelmente como consequência da agressão cirúrgica, concordando com IGNÁCIO (1995).

A partir da sexta semana, houve diminuição acentuada do processo inflamatório, estando ausente às nove semanas. Da mesma forma, IGNÁCIO (1995) e OHARA et al. (1995) observaram, por meio de análise histológica de leitões receptores diferentes, uma cinética de leucócitos para o sítio inflamatório semelhante a observada neste experimento. Inicialmente notou-se reação inflamatória aguda, com o predomínio de neutrófilos; posteriormente, um leve infiltrado inflamatório com o predomínio de mononucleares e no final, o desaparecimento do processo inflamatório.

Os polímeros e seus produtos de degradação, como resultado de sua composição química e morfologia superficial, podem influenciar diferentemente a quimiotaxia de leucócitos para o sítio inflamatório e afetar significativamente a diferenciação morfológica e ativação macrofágica (PELUSO et al., 1994; SAAD et al., 1996). Como a quimiotaxia é mediada, dentre outros, por fatores integrantes do processo inflamatório, a interação dos leucócitos com o material é determinante da intensidade e duração da resposta inflamatória e, portanto, pode ser responsável pela sustentação deste processo, o que não foi observado às nove semanas neste experimento.

As células gigantes multinucleadas observadas neste experimento também foram descritas por VILARINHO et al. (1996) em implantes colocados na câmara anterior do olho de camundongos. Entretanto, nenhum sinal de reação ao implante de polímero de mamona foi descrito por outros autores.

SAAD et al. (1996) citaram que a reação do tipo corpo estranho, assim como a ativação de macrófagos, é consequência da fagocitose de produtos tóxicos resultante da metabolização do implante. Mas também pode ser creditada a uma tentativa do organismo em remover o material implantado, induzindo o recrutamento de macrófagos.

Os aspectos microscópicos e radiológicos dos implantes evidenciaram a manutenção da integridade do polímero, sem indícios de reabsorção nas diversas etapas da pesquisa, inferindo ausência de metabolização. Como a biocompatibilidade do polímero depende do equilíbrio entre a degradação associada à ativação de macrófagos e a persistência da reação do tipo corpo estranho, o ideal é que o implante se comporte como material inerte, sem causar qualquer reação inflamatória, conforme recomendaram ANDERSON & MILLER (1984), ZHAO et al. (1990) e REMES e WILLIAMS (1992).

Em reações de polimerização, a presença de monômeros residuais livres pós-reação é relacionada diretamente à toxicidade desses polímeros, quando utilizados como implantes (FLETCHER et al., 1983). O tipo de reação (poliol + pré-polímero), utilizado na síntese do implante ora em avaliação, não permite “sobra” de

radicais pela sua própria origem não monomérica (CLARO NETO, 1997), podendo ser este um fator a menos no desenvolvimento de fenômenos tóxicos ou reacionais.

Apesar dos fabricantes do produto citarem suas propriedades bacteriostática e bactericida, não foi observada nenhuma ação sobre o crescimento de microrganismos quando o cilindro de polímero foi depositado em frascos contendo meio de cultura com bactérias.

A ausência de desintegração e de reabsorção do polímero e das extremidades ósseas receptoras, ao contrário do que ocorreu nas extremidades das falhas no grupo controle, sugere que o polímero atuou como um espaçador. Além disto, os resultados demonstram que o implante foi preenchido de maneira gradual por tecido ósseo novo, sem causar respostas adversas. Esta pesquisa não demonstrou indícios de que o polímero é biodegradável, mas que apresenta a função de espaçador osteocondutor. Esta ação também foi confirmada quando foi estabelecido no grupo controle desvio de alinhamento dos fragmentos proximal e distal do rádio da ordem de 27%, que não foi observado no grupo tratado.

A preocupação com a resistência mecânica dos implantes de substituição óssea parece óbvia e tem sido uma constante, particularmente para aplicações em ossos longos (SCHIMITT et al., 1989; DE CONTI, 1997). Nos membros que receberam o implante, o material suportou bem as forças mecânicas exercidas pela marcha do animal. Ao contrário, a ausência do polímero na falha criada no grupo controle predispôs o desvio dos ossos receptores em 27% dos raios operados. Também, segundo CLARO NETO (1997), a adição de carbonato de cálcio durante o processamento confere melhores padrões de resistência e elasticidade em relação ao tecido ósseo.

É óbvia a afirmação de SPIESSL (1976) de que a ausência de movimentação e a pequena incidência de forças mecânicas são fatores facilitadores para a utilização de implantes, sendo estas regiões mais favoráveis ao seu emprego. Associe-se a esta informação o fato de que em 100% dos implantes o polímero não foi reabsorvido, nem mostrou características de desfiguração no local da implantação.

Em alguns pontos ocorreu crescimento ósseo em íntimo contato com o polímero de mamona, havendo crescimento no interior dos poros do implante e

penetração por tecido fibroso de reparação. Internamente, como o polímero não sofreu reabsorção, o osso novo cresceu entre os poros que se comunicavam.

Como radiográfica e histologicamente foi observado que o implante manteve a forma e dimensões originais e, além disso, impediu a reabsorção do osso receptor, pode ser inferido que isto provavelmente aconteceu pela manutenção da transmissão da carga mecânica através do osso receptor.

No presente estudo verificou-se que o polímero implantado orientou o crescimento ósseo pela sua superfície, principalmente a partir do perióstio dos fragmentos ósseos receptores. Também ficou evidente a proliferação óssea a partir do perióstio da ulna. Nesta situação, o crescimento ósseo ficou confinado abaixo do implante, podendo ter participado do seu deslocamento do interior da falha.

Nos estudos realizados por OHARA (1995) em ossos longos, CARVALHO et al. (1997) em cavidades alveolares e TEIXEIRA et al. (1995) em mandíbulas de ratos, utilizando o mesmo implante, mas sem adição de carbonato de cálcio, não foram feitas observações referentes à resistência do material, já que os defeitos ósseos eram de natureza segmentar, não expondo os implantes a grande stress mecânico. IGNÁCIO (1995) refere em seus achados que, apesar da ocorrência de angulação da resina em alguns segmentos, o material suportou bem as forças mecânicas exercidas pela marcha do animal, embora também tenha produzido falhas ósseas de natureza segmentar. Em comunicações recentes, ARA (1998) relata experiência clínica de 3 anos com o uso do polímero de mamona em fixação de coluna vertebral e CAVALCA (1998), com próteses totais de quadril, ambos destacando a boa resistência do material nestas aplicações, que também pôde ser confirmada pelos resultados aqui obtidos.

A capacidade do polímero de suportar forças mecânicas já havia sido comprovada por SCHIMITT et al. (1989) em casos de soltura de próteses em humanos, e nessas condições, acelerou a reparação óssea secundária e atuou como veículo para antibioticoterapia adjunta. De maneira semelhante, os poros do polímero utilizado nesta pesquisa e sua higroscopia foram veículos para a medula óssea associada aos implantes dos animais dos grupo M, que, da mesma maneira observada por BARROS (2000) e comprovada pelos achados radiográficos e histológicos,

participou efetivamente como doadora de células para o processo osteogênico local, conferindo maior reparação ao grupo M, quando comparado ao P.

Também foi evidente, em ambos os grupos, uma intensa neovascularização, que pode ter contribuído efetivamente para a reparação. Se o polímero utilizado possui algum fator indutor vasculogênico, a metodologia empregada não pôde comprovar.

Na avaliação radiográfica da interface enxerto/osso ao longo do tempo, verifica-se uma delimitação evidente, caracterizada por uma linha de baixa radiodensidade, determinando a imagem de ausência de osteointegração, correspondendo, como confirmado pela microscopia de luz, à presença de tecido fibroso de reparação.

Histologicamente, em todos os implantes dos raios, foi observada a presença de tecido conjuntivo organizado e em contato com a superfície da poliuretana. Este tecido penetrava superficialmente nos poros presentes na periferia do implante, propiciando maior adesão do cilindro aos ossos receptores. Pode-se inferir que, de acordo com os resultados de IGNÁCIO (1995), esta formação fibroblástica tende a ser substituída por lamelas ósseas ao longo do tempo, como ele observou às 16 semanas. Além disso, a presença de colágeno aumenta a cristalização e permite a ligação de proteínas não colágenas e fatores de crescimento (RIPAMONTI, 1991).

Os cortes histológicos na região da falha dos raios controle revelaram faixas delgadas de tecido conjuntivo fibroso entremeada de camada de tecido ósseo novo. Radiograficamente, foi observada proliferação óssea a partir das extremidades da falha, de forma irregular e incompleta, bem como reação osteogênica com esclerose óssea nas extremidades da falha caracterizando maturidade do processo.

A observação de tecido conjuntivo fibroso na região da falha e entremeada a brotos de tecido ósseo nos raios controle remete aos dados de BOLANDER e BALIAN (1986), que relataram que falhas ósseas, deixadas sem preenchimento, desenvolvem lamelas ósseas de regeneração de maneira anárquica, com predominância de tecido conjuntivo fibroso.

De qualquer forma, os dados disponíveis permitem afirmar que não ocorreu total incorporação dos implantes de polímero de mamona adicionado de 40% de carbonato de cálcio. CARVALHO et al. (1997) deram grande importância à interface entre um material implantado e o tecido ósseo adjacente, definindo o conceito de osteointegração como uma interligação estrutural e funcional entre um osso organizado e o implante. Ainda no que diz respeito à interface, a formação de uma cápsula fibrosa circundando o implante, de acordo com WEISS (1986), deveria ocorrer preferencialmente somente nas fases iniciais de sua aplicação.

Nas amostras dos raios implantados nos raios nos animais, observou-se neoformação óssea de maneira gradual e progressiva, porém mais intensa e precoce naqueles que receberam o polímero associado à medula óssea.

KHARMANDAYAN (1997) não relatou em seus estudos crescimento ósseo trans-resina, mas, em ambos os grupos (P e M), pelas avaliações histológicas, observou-se crescimento ósseo pelos poros comunicantes e superficiais do implante, assim como IGNÁCIO (1995) observou crescimento ósseo sobre a superfície da resina, que perdeu seu aspecto poroso, como se sofresse uma compactação progressiva. Também, à semelhança dos resultados obtidos por este autor, neste estudo, radiograficamente, foi observada uma linha radioluscente, semelhante a cortical óssea e perioste em um animal.

A importância da porosidade dos implantes, nos fenômenos de osteocondução, vem sendo destacada desde a introdução das cerâmicas e dos polietilenos na substituição óssea e, muitas vezes, é considerada pré-requisito para a ocorrência de crescimento ósseo (HOLMES et al., 1986). Por outro lado, esta porosidade continua sendo motivo de controvérsia, devido a grande diversidade estrutural, no que se refere a variação do diâmetro dos poros e seu tamanho ideal (JARCHO, 1981). Novos materiais, com uma estrutura porosa organizada, têm sido desenvolvidos a fim de melhorar a osteointegração dos implantes (SMITH, 1998).

A poliuretana de mamona adicionada de cálcio apresenta estrutura porosa, mas pode-se afirmar que esta porosidade, conseqüente à sua expansão no processo de polimerização, não representa um verdadeiro sistema canalicular de poros intercomunicantes. No entanto, isto não representou impedimento ao fenômeno

de osteocondução, com o polímero sustentando o crescimento ósseo em sua superfície e internamente, quando os poros se comunicavam. Já para FRASCINO (1998), o crescimento ósseo não ocorreu pelos poros, mas de forma trans-resina através da região em que houve fragmentação do polímero. Questiona-se, portanto, o conceito de osteocondução deste autor. Por outro lado, OHARA et al. (1995) e RAMALHO (1998) referem presença de tecido ósseo novo na transição implante-osso e no interior do implante.

Confrontando estes dados com os resultados ora apresentados, pode-se deduzir que as características físicas da poliuretana de mamona adicionada de 40% de carbonato de cálcio, podem interferir diretamente nos fenômenos de osteocondução em fraturas recentes. No entanto, fatores relacionados com o diâmetro dos poros e suas interconexões não puderam ser controlados na sua preparação e podem ter interferido, provavelmente, na sua integração com os tecidos do hospedeiro.

Como no material estudado por ROUX et al. (1988) e GÜHNAN et al. (1994), a estrutura porosa do cilindro favoreceu a sua invasão por tecido de granulação, aumentando suas chances de mineralização. Segundo WHITE e SHORS (1986), van EEDEN e RIPAMONTI (1994) e SILVA (2000), a presença de osso dentro dos poros do material implantado é evidência de que ele possui propriedades osteocondutoras, que podem ser confirmadas pela fluorescência à tetraciclina e pela histologia.

Os resultados obtidos permitem aceitar o conceito para osteocondução de CORNELL e LANE (1998), quando sugerem que o processo requer porosidade, seguindo os mesmos princípios observados durante o reparo da fratura e remodelação ósseas, e que a alta concentração de CaPO_4 ao redor do implante osteocondutor estimula a deposição de osso novo, acrescentando que a osteocondução parece ser potencializada nos materiais que não somente apresentam estrutura física semelhante à do osso, como também composição química semelhante e que aceitam a presença de células primordiais em sítio adequado.

Com relação à possibilidade de propriedades osteoindutoras do implante, os resultados permitem afirmar que a mesma não está presente no polímero utilizado, pois não foi observada qualquer marcação fluorescente nos implantes

abdominais, com os polímeros mantendo sua forma, sem qualquer evidência de crescimento ósseo à histologia, assim como observaram VILARINHO (1996), que avaliou a resina implantada em câmara anterior do olho de ratos, RAMALHO (1998), na mandíbula de ratos, e FRASCINO (1998), após implante da resina na calota craniana de coelhos.

Portanto, como o implante associado ao carbonato de cálcio não demonstrou propriedades osteoindutoras e considerando que a reparação óssea é um processo dependente de resposta celular, as células presentes na medula e que desempenham papel na osteogênese dependeram de um estímulo local para produção óssea. Este estímulo estava presente nas falhas ósseas, ao contrário do abdômen, onde não houve formação de tecido ósseo.

É evidente que a neoformação de osso novo na região de um implante está relacionada ao estímulo (fatores de crescimento), de um meio receptor adequado e de uma estrutura que permita invasão vascular e proliferação celular osteoblástica ou a diferenciação de células para a linhagem osteogênica.

No presente experimento ficou claro que a adição da *stem cell* medular ao material aloplástico representou uma somatória de propriedades desejáveis por associar a capacidade do polímero em prover suporte à penetração de tecido ósseo à osteogênese, conforme descrito por OLIVEIRA et al. (2000) e SILVA (2000) e observado radiograficamente nos melhores resultados do grupo M em relação ao P.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Reconhecida a necessidade de reposição cirúrgica de perdas ósseas na prática clínica, o experimento foi conduzido no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em 36 coelhos da raça Nova Zelândia brancos, com idade entre cinco e seis meses e peso entre 3 e 4 kg, com o objetivo de avaliar o processo de reparação tecidual e o comportamento do polímero vegetal extraído de óleo de mamona adicionado de carbonato de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena, aplicado tanto em sítio heterotópico como na reparação de falhas ósseas experimentais em rádio de coelhos.

Foram desenvolvidas falhas ósseas no rádio de quinze coelhos, que foram preenchidas com cilindros de polímero de mamona, com as dimensões semelhantes às das falhas, adicionado de 40% de carbonato de cálcio. Em outros quinze animais, medula óssea obtida por aspiração percutânea da crista ilíaca foi adicionada ao polímero, impregnando-o totalmente. Para permitir a avaliação da capacidade osteoindutora do polímero em sítio heterotópico, seis coelhos receberam seis implantes no músculo reto abdominal: três coelhos receberam implantes embebidos em medula óssea autógena recém colhida e os outros três, sem embebição.

A avaliação radiográfica dos ossos que receberam o implante do polímero sem concomitante aplicação de medula óssea (grupo P), demonstrou áreas irregulares de calcificação, ocupando o defeito em suas porções periféricas, de forma irregular e sobre o polímero. Em 100% dos animais a interface polímero/osso receptor encontrava-se radiotransparente nas radiografias iniciais e sua radiopacidade

foi aumentando nas radiografias posteriores. Não foram observados desvio de eixo ósseo ou reabsorção das extremidades receptoras do implante. Já nos ossos que receberam o implante do polímero associado a medula óssea (grupo M), foi demonstrado um padrão de radiopacidade mais intenso, mais regular e mais precoce, quando comparado ao grupo P. Estas condições foram progressivas em relação ao tempo, observando-se pontos de radiopacidade sobre o polímero e proliferação periosteal.

Nas avaliações microscópicas realizadas, foram observadas evidências de formação de tecido ósseo imaturo com tendência a organização, brotos isolados de neoformação óssea com tendência a formar osso sobre o polímero, em seus poros superficiais e por entre os poros comunicantes. Nas observações histológicas foi evidente a atividade osteogênica pela superfície e poros do polímero.

Considerando que a reparação óssea é um processo dependente de resposta celular, as células medulares associadas ao polímero desempenharam papel na osteogênese, que foi dependente de estímulo local. Este estímulo estava presente nas falhas ósseas, ao contrário do abdômen, quando o fragmento, neste aspecto, permaneceu inerte.

Quando o cilindro de polímero foi depositado em frascos contendo meio de cultura com bactérias não foram observadas ações sobre o crescimento de microrganismos.

Com base nesses achados, pode-se concluir que o implante:

1. Permite a ocorrência de osteogênese e osteocondução na sua estrutura, com reparação dos defeitos por formação de osso novo ocorrendo de forma progressiva e satisfatória, principalmente quando adicionado da *stem cell* medular, em ambiente adequado.
2. Permite a migração de capilares, tecidos perivasculares e células osteoprogenitoras entre os espaços porosos num processo inicial de tecido fibrovascular invadindo a estrutura porosa superficial, seguido da deposição de osso diretamente sobre ela. Este arcabouço passivo conduz o crescimento do osso e de tecido fibrovascular, como um espaçador osteocondutor.

3. Incorporou-se ao tecido receptor de forma lenta e incompleta até as nove semanas do estudo.
4. É biocompatível, apesar da presença de células gigantes e camada fibrosa envolvente.
5. Não apresenta propriedades osteoindutoras, nem ações bacteriostática ou bactericida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.M.; MILLER, K.M. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. **Biomaterials**, v.5, p.5-9, 1984.
- ARA, C.S. Experiência de três anos com o uso do polímero de Ricinus comunis em intervenções neurocirúrgicas. **Anais**. Jornada de Ciência e Tecnologia de Biomateriais, I. Vitória, setembro de 1998.
- ASHTON, B. A.; ALLEN, T. D.; HOWLETT, C. R.; EAGLESON, C. C.; HATTORI, A.; OWEN, M. E. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. **Clin. Orthop.**, n. 151, p.294-307, 1980.
- BARROS, S.V.S.G. **Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos**. Viçosa, MG: Departamento de Veterinária, 2000. 52p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- BERNARD, G.W. Healing and repair of osseous defects. **Dent. Clin. North Am.**, v.35, p.469-77, 1991.
- BISSADA, F.N.; HANGORSKY, U. Alveolar bone induction: alloplastis. **Dent. Clin. North Am.**, v.24, p.739-49, 1980.
- BOLANDER, M.E.; BALIAN, G. The use of demineralized matrix in the repair of segmental defects. **J. Bone Joint Surg.**, v.68A., p.1264-1274, 1986.
- BURWELL, R. G. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clin. Orthop.**, n. 200, p.125-141, 1985.
- CAFFESSE, R.G.; BECKER, W. Principles and techniques of guide tissue regeneration. **Dent. Clin. North Am.**, v.35, p.479-94, 1991.

- CARVALHO, T.L.L.; ARAUJO, C.A.C.A.; TEÓFILO, J.M.; BRENTAGANI, L.G. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.26, p.149-52, 1997.
- CAVALCA, D. Uso do composto ósteo-ricinus em reconstrução de perdas ósseas em ortopedia. **Anais. Jornada de Ciência e Tecnologia de Biomateriais, I.** Vitória, setembro de 1998.
- CHIERICE, G.O. **Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretanas derivadas do óleo de mamona.** São Paulo, SNM – PADCT – II, 1994. (Relatório Técnico – SNM – PADCT – II).
- CLARO-NETO, S. **Características físico-químicas de um poliuretano derivado do óleo de mamona utilizado para implantes ósseos.** São Carlos, 1997.127p. Tese (Doutorado), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- CORNELL, C.N.; LANE, J.M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. **Clin. Orthop.**, n.355, p.267-273, 1998.
- COSTA, R.P.; SCHALL, C.H. The use of Ricinus communis (mamona) polymer as a silicone substitute: a new material for prosthesis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN PLASTIC SURGERY, 3., São Paulo, March, 1992. **Proceedings.** São Paulo, Brazilian Society of Plastic Surgery, 1992. P.16.
- DAHLIN, C.; SENNERBY, L.; LEKHOLM, U. Generation of a new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. **Int. J. Oral & Maxillofac. Implants**, v.4, p.19-25, 1989.
- DE CONTI, O.J. **Estudo experimental da utilização de cerâmica no preenchimento de falha óssea.** Ribeirão Preto, 1997. 57p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- DUJONI, M.; AVILES, A.; AGNER, C.; FERNANDEZ, P.; CHARBEL, F.T. Cranioplasty: cosmetic or therapeutic? **Surg. Neurol.**, v.47, p.238-241, 1997.
- FLETCHER, A.M.; PURNAVEJA, S.; AMIN, W.M. ET AL. The level of residual monomer in self curing denture base materials. **J. Dent. Res.**, v.62, p.118-120, 1983.

- FRASCINO, L.F. **Implante de resina poliuretana vegetal em cranioplastia: estudo experimental em coelhos.** Ribeirão Preto. 1998. Dissertação (Mestrado em Ortopedia e Traumatologia). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- GÜNHAN, O.; BAL, E.; CELASUN, B.; SENGUN, O.; FINCI, R. A comparative histological study of non-porous and micro-porous (algae-derived) hydroxyapatite ceramics. **Aust. Dent. J.**, v.39, p.25-7, 1994.
- HEALEY, J.H.; ZIMMERMAN, P.A.; McDONNELL, J.M.; LANE, J.M. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. **Clin. Orthop.**, n.256, p.280-285, 1990.
- HEIPLE, K.G. A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. **J. Bone Joint Surg**, v.45A, p.1593-1616, 1963.
- HOLMES, R.E.; BUCHOLZ, R.W.; MOONEY, V. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defects: a histometric study. **J. Bone Joint Surg.**, v.68A, p.904-911, 1986.
- IGNÁCIO, H. **Utilização do cimento derivado da mamona no preenchimento de falhas óssea: estudo experimental em coelhos.** Ribeirão Preto, 1995. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, n.157, p.259-278, 1981.
- KHARMANDAYAN, P. **Estudo da interface de contato entre osso e implantes de poliuretano sem e com carbonato de cálcio, empregando microscopia de luz e eletrônica de varredura, em coelhos.** São Paulo, 1997. Tese (doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- KORLOFF, B.; NYLN, B.; RIETZ, K. Bone grafting of skull defects. **Plastic Reconstr. Surg.**, n.52, p.378, 1973.
- MARCHANT, R.E.; ANDERSON, J.M.; HILTNER, A. et al. The biocompatibility of solution cast and acetone-extracted cast biomer. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.20, n.6, p.799-815, 1986.

- OHARA, G.H.; KOJIMA, K.E.; ROSSI, J.C. et al. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretana de mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortop. Bras.**, v.3, p.62-8, 1995.
- OLIVEIRA, D.R.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V. et al. Matriz óssea homóloga desmineralizada associada a medula óssea autógena no preenchimento de falhas segmentares em rádio de coelhos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, IV, Goiânia, outubro, 2000. **Anais**. Goiânia, Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000. p.89.
- PELUSO, G.; PETILLO, O.; RANIERI, M. et al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. **Biomaterials**, v.15, p.1215-20, 1994.
- POLIQUIL ARARAQUARA –POLÍMEROS QUÍMICOS LTDA.. Composto ósseo de ricinus. Araraquara, 2001. 1p. Boletim Técnico,1.
- RAMALHO, L.T.O. Biocompatibilidade da resina poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona: estudos histológicos. **Anais**. Jornada de Ciência e Tecnologia de Biomateriais, I. Vitória, setembro de 1998.
- REMES, A.; WILLIAMS, D.F. Immune response in biocompatibility. **Biomaterials**, v.13, p.731-43, 1992.
- RIPAMONTI, U. Morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of carbonate exoskeletons of coral. **J. Bone Joint Surg.**, v.73A., p.692-703, 1991.
- ROUX, F.X.; BRASNU, D.; LOTY, B. et al. Madreporic coral: a new bone graft substitute for cranial surgery. **J. Neurosurg.**, v.69, p.510-13, 1988.
- SAAD, B., MATTER, S.; CIARDELLI, G. et al. Interactions of osteoblasts and macrophages with biodegradable and highly porous polyesterurethane foam and its degradation products. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.32, p.355-66, 1996.
- SCHIMITT, H.; FOURNIER, J.A.; SKONDIA, V. The use of a biocompatible orthopaedic polymer in the treatment of loose total hip prosthesis. **J. Int. Med. Res.**, v.17, n.13, p.254-261, 1989.
- SCHLIEPHAKE, H.; NEUKAN, F.W.; HUTMACHER, D. et al. Enhancement of bone ingrowth into a porous hydroxyapatite-matrix using a reabsorbable polylactic

- membrane. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.52, p.57-63, 1994.
- SCHLIEPHAKE, H.; NEUKAN, F.W.; HUTMACHER, D. et al. Experimental transplantation of hydroxyapatite-bone composite grafts. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.53, p.46-51, 1995.
- SILVA, A.M. **Avaliação dos potenciais osteoindutor e osteocondutor da matriz óssea homóloga desmineralizada de coelho.** Viçosa, MG: Departamento de Veterinária, 2000. 62p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- SMITH, G. K.; LAFOND, E.; PUERTO, D.; GANNON, F. In vivo performance of Hedrocel® for bone ingrowth of structural orthopaedic implants in dogs. **Anais. Veterinary Orthopedic Society–25th Annual Conference.**, Snow Mass, 1998.. p. 28.
- SPIESSL, B. **New Concepts in Maxillofacial Bone Surgery.** Springer: Verlag; 1976. p.125.
- SUTTON, J.S.; WEISS, L. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells. **J. Cell Biol.**, v.28, p.303-32, 1966.
- TAKAGI, K.; URIST, M. R. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. **Clin. Orthop.**, n. 171. p. 224-231, 1982.
- TEIXEIRA, H.M.; VILARINHO, R.H.; RAMALHO, L.T.O. Reação à resina vegetal de mamona durante o processo de reparo em defeitos ósseos induzidos no corpo da mandíbula. In: JORNADA ACADÊMICA DE ARARAQUARA, 9, ARARAQUARA, 1995. Resumo... Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, 1995. p117.
- van EEDEN, S.P.; RIPAMONTI, U. Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.93, p.959-66, 1994
- van PUTTEN, M.C.; YAMADA, S. Alloplastic cranial implants made from computed tomographic scan generated casts. **J. Prosth. Dentistry**, n.1, p.103-108, 1992.

- VILARINHO, R.H.; HETEM, S.; RAMALHO, L.T.O. Implante de resina de poliuretana vegetal na câmara anterior do olho de camundongo – estudo histológico. **Odonto 2000 – Odontologia do século XXI – FAEPO**, v.1, p.25-9, 1996.
- VOLPON, J. B. A marcação do osso com substâncias fluorescentes. **Rev. Bras. Ortop**, v.20, n.5, p.207-210, 1985.
- WEISS, C.M. Tissue integration of dental endosseous implants: description and comparative analysis of the fibro-osseous integration and osseous integration systems. **J. Oral Implant.**, v. 12, n.2, p.169-214, 1986.
- WERNTZ, J. R.; LANE, J.M.; BURSTEIN, A. H.; JUSTIN, R.; KLEIN, R.; TOMIN, E. Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. **J. Orthop. Res.**, v. 14, n.1, p. 85-93, 1996.
- WHITE, E.; SHORS, E.C. Biomaterial aspects of intercore-200 porous hydroxyapatite. **Dent. Clin. North Am.**, v.30, p.49-67, 1986.
- YASZEMSKI, M.J.; PAYNE, R.G.; HAYES, W.C. et al. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. **Biomaterials**, v.17, p.175-85, 1996.
- ZHAO, Q.; AGGER, M.P.; FITZPATRICK, M. et al. Cellular interactions with biomaterials: in vivo cracking of pre-stressed pellethane 2363-80. **A. J. Biomed. Mater. Res.**, v.24, p.621-37, 1990.